

**UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

ANNEE : 2015

THESE 2015/TOU3/2007

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement par

DUAULT Caroline

LES IMMUNOTHERAPIES DANS LE TRAITEMENT DU CANCER :
EXEMPLE DE LA POTENTIALISATION DE L'ACTIVITE ANTICANCEREUSE
DES LYMPHOCYTES $T\gamma\delta$ PAR L'IL-33

Date de soutenance

19 janvier 2015

Directeur de thèse : Dr. POUPOT Mary

JURY

Président : Pr COUDERC Bettina
1er assesseur : Dr TERRISSE Anne-Dominique
2ème assesseur : Dr FOURNIE Jean-Jacques
3ème assesseur : Dr POUPOT Mary

*A mes parents, pour leur soutien de
tous les jours dans mes études,
depuis plus de onze ans...*

PERSONNEL ENSEIGNANT
de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier
au 1^{er} octobre 2014

Professeurs Émérites

M. BASTIDE R	Pharmacie Clinique
M. BERNADOU J	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G	Physiologie
M. CHAVANT L	Mycologie
Mme FOURASTÉ I	Pharmacognosie
M. MOULIS C	Pharmacognosie
M. ROUGE P	Biologie Cellulaire

Professeurs des Universités

Hospitalo-Universitaires

M. CHATELUT E	Pharmacologie
M. FAVRE G	Biochimie
M. HOUIN G	Pharmacologie
M. PARINI A	Physiologie
M. PASQUIER C (Doyen)	Bactériologie - Virologie
Mme ROQUES C	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A	Pharmacologie
Mme SALLERIN B	Pharmacie Clinique
M. SIÉ P	Hématologie
M. VALENTIN A	Parasitologie

Universitaires

Mme BARRE A	Biologie
Mme BAZIARD G	Chimie pharmaceutique
Mme BENDERBOUS S	Mathématiques – Biostat.
M. BENOIST H	Immunologie
Mme BERNARDES-GÉNISSON V	Chimie thérapeutique
Mme COUDERC B	Biochimie
M. CUSSAC D (Vice-Doyen)	Physiologie
Mme DOISNEAU-SIXOU S	Biochimie
M. FABRE N	Pharmacognosie
M. GAIRIN J-E	Pharmacologie
Mme MULLER-STAU MONT C	Toxicologie - Sémiologie
Mme NEPVEU F	Chimie analytique
M. SALLES B	Toxicologie
Mme SAUTEREAU A-M	Pharmacie galénique
M. SÉGUI B	Biologie Cellulaire
M. SOUCHARD J-P	Chimie analytique
Mme TABOULET F	Droit Pharmaceutique
M. VERHAEGHE P	Chimie Thérapeutique

Maîtres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires

M. CESTAC P	Pharmacie Clinique
Mme GANDIA-MAILLY P (*)	Pharmacologie
Mme JUILLARD-CONDAT B	Droit Pharmaceutique
M. PUISSET F	Pharmacie Clinique
Mme SÉRONIE-VIVIEN S	Biochimie
Mme THOMAS F	Pharmacologie

Universitaires

Mme ARÉLLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme AUTHIER H	Parasitologie
M. BERGÉ M. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme BON C	Biophysique
M. BOUJILA J (*)	Chimie analytique
Mme BOUTET E	Toxicologie - Sémiologie
M. BROUILLET F	Pharmacie Galénique
Mme CABOU C	Physiologie
Mme CAZALBOU S (*)	Pharmacie Galénique
Mme CHAPUY-REGAUD S	Bactériologie - Virologie
Mme COSTE A (*)	Parasitologie
M. DELCOURT N	Biochimie
Mme DERAÈVE C	Chimie Thérapeutique
Mme ÉCHINARD-DOUIN V	Physiologie
Mme EL GARAH F	Chimie Pharmaceutique
Mme EL HAGE S	Chimie Pharmaceutique
Mme FALLONE F	Toxicologie
Mme GIROD-FULLANA S (*)	Pharmacie Galénique
Mme HALOVA-LAJOIE B	Chimie Pharmaceutique
Mme JOUANJUS E	Pharmacologie
Mme LAJOIE-MAZENC I	Biochimie
Mme LEFEVRE L	Physiologie
Mme LE LAMER A-C	Pharmacognosie
M. LEMARIE A	Biochimie
M. MARTI G	Pharmacognosie
Mme MIREY G (*)	Toxicologie
Mme MONTFERRAN S	Biochimie
M. OLICHON A	Biochimie
M. PERE D	Pharmacognosie
Mme PHILIBERT C	Toxicologie
Mme PORTHE G	Immunologie
Mme REYBIER-VUATTOUX K (*)	Chimie Analytique
M. SAINTE-MARIE Y	Physiologie
M. STIGLIANI J-L	Chimie Pharmaceutique
M. SUDOR J	Chimie Analytique
Mme TERRISSE A-D	Hématologie
Mme TOURRETTE A	Pharmacie Galénique
Mme VANSTEELANDT M	Pharmacognosie
Mme WHITE-KONING M	Mathématiques

(*) titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires

Mme COOL C (**)	Physiologie
Mme FONTAN C	Biophysique
Mme KELLER L	Biochimie
M. PÉRES M. (**)	Immunologie
Mme ROUCH L	Pharmacie Clinique
Mme ROUZAUD-LABORDE C	Pharmacie Clinique

Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche

Mme PALOQUE L	Parasitologie
Mme GIRARDI C	Pharmacognosie
M IBRAHIM H	Chimie anal. - galénique

(**) Nomination au 1^{er} novembre 2014

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je remercie le professeur Bettina COUDERC, qui a accepté de présider le jury de cette thèse.

Je remercie également le Dr Jean-Jacques FOURNIE et le Dr Anne-Dominique TERRISSE, qui ont accepté de juger ces travaux de thèse et de participer à ce jury.

Je tiens à remercier chaleureusement ma directrice de thèse, Mary POUPOT. Mary, lorsque j'ai décidé de m'orienter dans la recherche, tu as été la première à me faire confiance et à m'accompagner dans cette nouvelle orientation. Grâce à ton soutien, je finis aujourd'hui mon doctorat et mon cursus d'études pharmaceutiques. Merci pour la richesse de nos échanges, tant au niveau personnel que professionnel.

Je remercie sincèrement Jean-Jacques FOURNIE, non plus en tant que membre du jury mais en tant que directeur de l'équipe 9 du CRCT ! Jean-Jacques, j'ai toujours apprécié nos échanges scientifiques et autres et la simplicité avec laquelle nous pouvons vous aborder malgré vos responsabilités. Je vous remercie pour votre soutien et votre considération.

Merci à tous les membres de l'équipe 9 du CRCT passés et présents : Emilie, Fred, Marie, Don-Marc, François, Julien, Pauline, Cédric, Anne, Christine, Delphine... et tous les autres ! Merci pour votre soutien, votre bonne humeur, les fous-rires et les coups de gueule. Mention spéciale pour mes collègues de bureau Marie et Don-Marc, et pour Emilie, qui m'ont supportée (dans tous les sens du terme !) pendant la rédaction de mes thèses et qui ont contribué à la qualité de ces manuscrits. Merci beaucoup, et je vous souhaite à tous le meilleur pour la suite, tant au niveau professionnel que personnel.

Je remercie aussi tous les membres du CRCT que j'ai côtoyé pendant plus de quatre ans, surtout parmi les équipes Manenti, Sarry/Récher et Brousset. A nos pauses café régénérantes, nappées de bonne humeur... Camille, Héléna, Fabienne, Srdana, j'ai une pensée particulière pour vous. Je vous souhaite à toutes beaucoup de réussite et de bonheur.

Je remercie également le staff administratif du centre, et notamment Sébastien et Laurence, toujours enclins à me simplifier la vie !

Sur un plan plus personnel, merci à tous mes amis rencontrés sur les bancs de la fac de pharmacie de Toulouse : Lucie, Anne-So, Aurélie, Flo, Laura, Audric et Fred ainsi que tous leurs conjoints/conjointes : Vincent, Rémy, Lionel, Alexis, Jeremy, Lorraine et Doriane et les petits nouveaux Arthur, Léon, Lizéa et les autres à venir. Cette thèse en particulier me rappelle la chance que j'ai de vous connaître, vous qui êtes devenus des amis si chers au fil du temps. Nous avons partagé des moments difficiles mais aussi tellement de choses positives. Beaucoup de bonheur à tous, en espérant vous avoir encore longtemps à mes côtés.

Marion, Welcome, Angeline, Matthieu, Marie... Nous nous connaissons depuis moins longtemps mais j'ai la chance d'avoir fait de très belles rencontres avec vous. Je vous souhaite beaucoup de bonheur et de réussite dans vos projets.

Encore plus loin dans le temps et toujours aux côtés les uns des autres... Sonia, Anaïs, Brigitte, Adeline, Angeline, Nanou, vos amoureux J-D, Guillaume, Clément, Jörn, Fabien et vos petits bouts Sacha, Charly, Sarah, Elise et à tous ceux qui viendront ! Le chemin a été long depuis les bancs du lycée, et pourtant vous êtes encore là pour moi. Là aussi, j'ai énormément de chance d'avoir des amis aussi proches, dans les moments difficiles comme dans les moments les plus joyeux, malgré le temps qui nous manque à tous et la distance. Venez me voir quand je serai expatriée, parce que vous allez me manquer !!!

Pour les cousins, cousines, oncles et tantes... des bises à vous tous. A mes grands-mères, Céline et Bernadette, que j'embrasse.

A ma famille : Olivier mon frère, Sébastien mon beau-frère, et mes parents, Guy et Marianne. Les mots me manquent pour vous exprimer toute ma reconnaissance. Merci pour votre soutien sans faille, pour m'avoir épaulée et soutenue dans tous mes choix, pour votre patience, pour avoir cru en moi... Je n'aurai pas pu le faire sans vous. Je ne serai pas Steffi Graf, mais j'essaierai de continuer à vous rendre fiers quand même. Avec tout mon amour...

Et aussi à dithyrambique, anachorète, guéridons et tous les autres...

SOMMAIRE

SOMMAIRE	5
FIGURES ET TABLES	7
ABREVIATIONS ET ANGLICISMES.....	9
PREAMBULE.....	12
INTRODUCTION	13
I- PRINCIPAUX EFFECTEURS DE L'IMMUNITE ANTITUMORALE.....	14
I-1- Les effecteurs de l'immunité innée	15
I-1-1- Les cellules dendritiques.....	15
I-1-2- Les cellules NK	16
<i>I-1-2-1- Récepteurs des cellules NK, NKRs</i>	17
<i>I-1-2-2- Fonctions antitumorales</i>	18
I-2- Les cellules de l'immunité adaptative	19
I-2-1- Les lymphocytes T CD4	19
I-2-2- Les lymphocytes T CD8	21
II- LES LYMPHOCYTES T $\gamma\delta$	23
II-1- Répertoire et fonctionnalités	23
II-1-1- Répertoire	24
II-1-2- Fonctionnalités	25
<i>II-1-2-1- Pléiotropie fonctionnelle et plasticité cellulaire</i>	25
<i>II-1-2-2- Fonctions effectrices</i>	26
II-2- Sous-populations de lymphocytes T V γ 9V δ 2	29
II-3- Réactivité des lymphocytes T V γ 9V δ 2.....	32
II-3-1- Les phosphoantigènes	32
<i>II-3-1-1- Nature des phosphoantigènes</i>	32
<i>II-3-1-2- Biosynthèse des phosphoantigènes</i>	33
<i>II-3-1-3- Interaction TCR Vγ9Vδ2 et phosphoantigènes</i>	35
II-3-2- La butyrophiline 3A1	36
II-3-3- Autres molécules modulatrices de l'activation des lymphocytes T V γ 9V δ 2	39
<i>II-3-3-1- Les alkylamines et les aminobiphosphonates</i>	39
<i>II-3-3-2- Les NKRs</i>	40
<i>II-3-3-3- Les cytokines</i>	42
<i>II-3-3-4- Les Toll-Like Receptors</i>	43
<i>II-3-3-5- Les récepteurs Fc</i>	43
II-4- Propriétés antitumorales des lymphocytes T V γ 9V δ 2	44
III- LE MICROENVIRONNEMENT TUMORAL.....	48
III-1- Immuno-surveillance antitumorale.....	49
<i>III-1-1-1- Reconnaissance des cellules tumorales</i>	49
<i>III-1-1-2- Dynamique de la réponse immunitaire antitumorale</i>	50
III-2- Immuno-édition tumorale et immuno-échappement	53
III-2-1- Théorie de l'immuno-édition des tumeurs	53
III-2-2- Phase d'équilibre et immuno-édition des cellules cancéreuses	54
III-2-3- L'immuno-échappement tumoral.....	55
<i>III-2-3-1- Altérations survenant sur les cellules cancéreuses</i>	56

III-2-3-2- <i>Modification du microenvironnement tumoral</i>	57
IV- L'INTERLEUKINE 33	60
IV-1- L'IL-33 : alarmine et cytokine de la famille de l'IL-1.....	61
IV-1-1- L'IL-33 est une alarmine	61
IV-1-1-1- <i>La mort cellulaire immunogénique</i>	61
IV-1-1-2- <i>Définition des alarmines</i>	63
IV-1-1-3- <i>Dualité d'action des alarmines en cancérologie : exemple d'HMGB1</i>	66
IV-1-2- L'IL-33, membre de la famille de l'IL-1.....	67
IV-1-2-1- <i>Structure générale</i>	68
IV-1-2-2- <i>Récepteur activateur et voies de signalisation</i>	70
IV-2- Production et libération de l'IL-33	71
IV-2-1- Localisation tissulaire	71
IV-2-2- Obtention des formes matures de l'IL-33.....	72
IV-2-3- Libération extracellulaire.....	73
IV-2-4- Régulation négative de l'IL-33	73
IV-3- Fonctions biologiques de l'IL-33 : une cytokine aux multiples facettes	75
IV-3-1- L'IL-33, un facteur de transcription ?.....	75
IV-3-2- Bioactivités sur le système immunitaire.....	76
IV-3-2-1- <i>L'IL-33 : un puissant inducteur de réponse Th2</i>	76
IV-3-2-2- <i>Activation des lymphocytes régulateurs</i>	80
IV-3-2-3- <i>L'IL-33 est aussi inductrice de réponse immunitaire Th1</i>	82
IV-4- L'axe IL-33/ST2 en physiopathologie	83
IV-4-1- Pathologies inflammatoires et auto-immunes	84
IV-4-2- Maladies cardiovasculaires.....	86
IV-4-3- Immunité anti-infectieuse	86
IV-4-4- IL-33/ST2 et cancers	87
IV-4-4-1- <i>IL-33 sérique : corrélation avec la maladie ?</i>	87
IV-4-4-2- <i>L'IL-33 dans le microenvironnement tumoral</i>	88
IV-4-4-3- <i>L'IL-33 et la réaction immunitaire antitumorale</i>	89
V- LES IMMUNOTHERAPIES ANTICANCEREUSES	91
V-1- Immunothérapies passives	91
V-1-1- Les anticorps monoclonaux thérapeutiques	91
V-1-1-1- <i>Structure et mécanismes d'action</i>	92
V-1-1-2- <i>Les AcMo en clinique</i>	93
V-1-2- Le transfert adoptif de lymphocytes T cytotoxiques	97
V-2- Immunothérapies actives.....	98
V-3- L'immunomodulation.....	100
V-4- Les lymphocytes T V γ 9V δ 2 en immunothérapie anticancéreuse	103
DEMARCHE SCIENTIFIQUE ET OBJECTIFS DES TRAVAUX DE RECHERCHE.....	110
RESULTATS.....	113
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	143
BIBLIOGRAPHIE.....	148

FIGURES ET TABLES

Figure 1 : Principaux composants du système immunitaire.....	14
Figure 2 : Activation des DCs et présentation des Ags.....	16
Figure 3 : Activation des cellules NK par les cellules tumorales	18
Figure 4 : Les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4.....	21
Figure 5 : Vagues de développement des lymphocytes T $\gamma\delta$ chez l'Homme.	23
Figure 6 : Organisation des loci des gènes du TCR humain.....	24
Figure 7 : Fonctions régulatrices des lymphocytes T $\gamma\delta$ aux différents stades de la réponse immunitaire ..	29
Figure 8 : Les différentes sous-populations des lymphocytes T V γ 9V δ 2	31
Figure 9 : Premiers PAgS isolés à partir de M. tuberculosis.....	32
Figure 10 : Formule générale des PAgS	33
Figure 11 : Les voies naturelles de production des phosphoantigènes	34
Figure 12 : Hypothèses sur le fonctionnement de la butyrophiline CD277 sur l'activation des lymphocytes T V γ 9V δ 2	37
Figure 13 : Hypothèses proposées pour l'activation du TCR V γ 9V δ 2 par les PAgS et BTN3A1	38
Figure 14 : Formule générale des ABP.....	39
Figure 15 : Modulation de l'activation des lymphocytes T $\gamma\delta$ en fonction des signaux reçus par le TCR et les NKRs.....	41
Figure 16 : Les cytokines de la famille de l'IL-2, leurs récepteurs et leurs voies de signalisation	42
Figure 17 : Mécanismes de mort cellulaire induite par les granules lytiques	46
Figure 18 : Voies de signalisation des ligands et récepteurs de mort.....	47
Figure 19 : Potentiel cytotoxique des lymphocytes T V γ 9V δ 2 vis-à-vis des cellules cancéreuses.	47
Figure 20 : Représentation schématique du microenvironnement tumoral	48
Figure 21 : Les mécanismes de reconnaissance des cellules tumorales par le système immunitaire.....	49
Figure 22 : Action coordonnée des cellules de l'immunité innée et adaptative dans la réponse immunitaire antitumorale	51
Figure 23 : Les trois phases de « l'immuno-édition » du cancer.....	54
Figure 24 : Mécanismes responsables de l'immuno-échappement tumoral	56

Figure 25 : L'IL-33 est un agoniste de la famille de cytokines de l'IL-1 qui possède les propriétés d'une alarmine.	60
Figure 26 : Cascade évènementielle de la mort cellulaire immunogénique	62
Figure 27 : L'IL-33 possède les caractéristiques d'une alarmine.....	65
Figure 28 : Dualité d'action d'HMGB1 extracellulaire sur les tumeurs	67
Figure 29 : Ligands et récepteurs de la famille de l'IL-1.....	68
Figure 30 : Structure tri-dimensionnelle de l'IL-33 et de la chaîne α de son récepteur, ST2	69
Figure 31 : Voies de signalisation des cytokines de la famille de l'IL-1	70
Figure 32 : Expression et maturation de l'IL-33	72
Figure 33 : Mécanismes de régulation négative de l'IL-33	74
Figure 34 : L'IL-33 dans la réponse inflammatoire de type Th2	80
Figure 35 : Bioactivités de l'IL-33 sur les cellules du système immunitaire	83
Figure 36 : Classification des différents types d'AcMo thérapeutiques selon l'origine de leurs parties variables et constantes	92
Figure 37 : Méthodes pour modifier génétiquement les lymphocytes T afin de leur conférer une spécificité contre des Ags associés aux tumeurs	98
Figure 38 : Mécanismes d'ADCC des lymphocytes T V γ 9V δ 2 et des cellules NK	105
Figure 39 : Les stratégies d'immunothérapies antitumorales basées sur les lymphocytes T V γ 9V δ 2	106
Figure 40 : Les cellules issues des lignées IL-33 $\gamma\delta$ -pcl et IL-2 $\gamma\delta$ -pcl possèdent la même activité cytotoxique vis-à-vis des cibles tumorales hématopoïétiques	139
Figure 41 : L'IL-33 n'est pas toxique pour les cellules humaines du sang périphérique en culture <i>in vitro</i>	140
Table 1 : Les différentes sous-populations de lymphocytes T $\gamma\delta$ et leurs fonctions biologiques	25
Table 2 : Exemples de phosphoantigènes	33
Table 3 : Les alarmines, leurs fonctions physiologiques et leurs rôles en physiopathologie	64
Table 4 : AcMo actuellement approuvés par la FDA en oncologie et leurs mécanismes d'action	93

ABREVIATIONS ET ANGLICISMES

γ_c	Chaîne γ du récepteur de l'IL-2
ABP	Aminobiphosphonate
Ac	Anticorps
AcMo	Anticorps monoclonal(aux)
ACT	Transfert adoptif de lymphocytes T cytotoxiques
ADC	Agent thérapeutique conjuguant un AcMo et un agent chimique
ADCC	Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Phagocytose dépendante des anticorps
Ag	Antigène
AICD	Mort cellulaire induite par l'activation [des récepteurs de mort]
ARC	AcMo couplé à un radioélément
ARN	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine tri-phosphate
ATU	Autorisation temporaire d'utilisation
BCG	Bacille de Calmette et Guérin
BCR	Récepteur des lymphocytes B
BrHPP	Bromohydrine pyrophosphate
BTN	Butyrophiline
CAF	Fibroblastes associés au cancer
CD	Cluster de différenciation
CDC	Cytotoxicité cellulaire dépendante du complément
CDR	Régions déterminant la complémentarité
CEA	Antigène carcino-embryonnaire
CETC	Carcinome épidermoïde de la tête et du cou
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	Cellules présentatrices d'antigènes
CTL	Lymphocytes T cytotoxiques
CTLA-4	Protéine associée aux lymphocytes T cytotoxique -4
DAMP	Motif moléculaire associé aux signaux de danger
DAP10	DNAX-activating protein of 10 kDa
DC	Cellules dendritiques
DR4/5	Récepteurs de mort 4/5
EAE	Encéphalomyélite auto-immune expérimentale
EBV	Virus d'Epstein-Barr
EPO	Peroxydase des polynucléaires éosinophiles
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FasL	Ligand de Fas
FBXL19	F-box and leucine-rich repeat protein 19
FcR	Récepteur des fragments constants des anticorps
FDA	Food and drug administration
FGF	Facteur de croissance des fibroblastes
FLICE	FADD-like interleukin-1 beta-converting enzyme = caspase 8

FLIP	FLICE-like inhibitory protein
Foxp3	Forkhead box P3
GITR	Glocucorticoid-induced TNF receptor-related protein
GM-CSF	Facteur stimulant les colonies de granulocytes et macrophages
GWAS	Etude d'association pangénomique
Helix-turn-helix	Hélice-virage-hélice
HER	Récepteurs des facteurs de croissance épidermiques humains
HEV	Veinules à endothélium épais
HHV-8	Herpesvirus humain de type 8
HLA	Antigènes des leucocytes humains
HDMAPP	(E)-Hydroxydiméthylallyl pyrophosphate
HMGB1	High Mobility Group Box 1
HPV	Papillomavirus humain
HSP	Protéines de choc thermique
ICAM-1	Molécule d'adhésion intercellulaire-1
ICOS	Inducible T cell costimulator
IDO	Indoléamine 2,3 dioxygénase
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
Ig-like	Apparenté aux Ig
IL-	Interleukine
IL-1F	Cytokines de la famille de l'IL-1
IL-1 like	Domaine protéique retrouvé chez tous les membres de la famille de l'IL-1
ILC	Cellules lymphoïdes innées
ILT2	Immunoglobulin-like transcript 2
iNKT	Lymphocytes T Natural Killer invariants
iNOS	Enzyme de synthèse (synthase) inductible de l'oxyde nitrique
IPP	Isopentenyl pyrophosphate
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM	Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif
JAK	Janus kinase
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KIR	Récepteur apparenté aux Ig des cellules tueuses
KLF-2	Krüppel-like Factor 2
Knock-down	Diminution forcée de l'expression d'un gène
LANA	Antigène nucléaire associé à la latence
LDL	Lipoprotéines de basse densité
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MBP	Protéine basique majeure
MDSCs	Cellules suppressives dérivées de la moelle
MIC	Protéine apparentée au CMH de classe I
MIP	Macrophage inflammatory proteins
MMP	Métallo-protéases matricielles
MSC	Cellules souches mésenchymateuses
NCR	Récepteurs de cytotoxicité naturel

NF-HEV	Facteur nucléaire des HEVs
NK	Natural Killer
NKG2	Natural killer cell lectin-like receptor 2
NKR	Récepteurs caractéristiques des cellules NK
OVA	Ovalbumine
PAg	Phosphoantigène
PAMP	Motif moléculaire associé aux pathogènes
PAP	Phosphatase acide prostatique
PBMC	Cellules mononucléées du sang périphérique
PD-1	Récepteur de mort programmée-1
PD-L1	Ligand du récepteur de mort programmée-1
PGE2	Prostaglandine E2
PRR	Récepteurs reconnaissant les motifs [de danger]
RAG	Gène activateur de la recombinaison
RAGE	Récepteur des produits terminaux de glycation
RANTES	Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
RECIST	Critères d'évaluation de la réponse clinique dans les tumeurs solides
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RTX	Rituximab
SCID	Immunodéficiência sévère combinée
SIGIRR	Récepteur de la famille de l'IL-1 à un seul domaine Ig
sST2	Forme soluble du récepteur ST2
ST2L	Forme membranaire du récepteur ST2
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TAA	Antigènes associés aux tumeurs
TAM	Macrophages associés aux tumeurs
TAP	Transporter associated with antigen processing
T _{CM}	Lymphocyte T central mémoire
TCR	Récepteur des lymphocytes T
TDO	Tryptophan 2,3-dioxygénase
T _{EM}	Lymphocyte T effecteur mémoire
T _{EMRA}	Lymphocyte T effecteur mémoire avec différenciation terminale
TGF	Facteur de croissance transformant
Th	T helper
TILs	Lymphocytes infiltrants les tumeurs
TIR	Domaine d'homologie des récepteurs TLR/Interleukine-1
TLR	Toll-Like receptors
T _N	Lymphocyte T naïf
TNF	Facteur de nécrose tumorale
TRAIL	Ligand inducteur d'apoptose apparenté au TNF
Tregs	T régulateurs
TSA	Antogènes spécifiques des tumeurs
TTZ	Trastuzumab
ULBPs	UL16 binding proteins
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

PREAMBULE

Comme pour tous mes confrères pharmaciens, cette thèse vient conclure mon cursus universitaire des études pharmaceutiques. Aujourd'hui orientée dans la recherche médicale et arrivant au terme de mon doctorat, cette thèse représente également pour moi un pont entre mes études pharmaceutiques et mes nouvelles orientations professionnelles.

Le développement de nouvelles thérapies est un processus complexe, long et coûteux. Les étapes les plus médiatisées sont souvent celles des essais cliniques, qui se déroulent finalement tout au bout du processus de recherche. Toutes les étapes de recherches fondamentales nécessaires à la compréhension des processus biologiques dérégulés dans les pathologies et qui permettent de déterminer les nouvelles cibles thérapeutiques sont souvent moins connues. Cette thèse a pour but d'illustrer la démarche scientifique et la mise en œuvre de l'expérimentation qui sont à la base du développement de nouvelles thérapies. Durant mon doctorat, réalisé sous la supervision du Dr. Mary Poupot au sein du CRCT de Toulouse, j'ai étudié l'immunomodulation des lymphocytes T V γ 9V δ 2 par l'IL-33, une alarmine présente naturellement dans le microenvironnement tumoral. Ce projet vise à déterminer le potentiel thérapeutique de l'IL-33 en immunothérapie anticancéreuse basée sur l'action cytotoxique des lymphocytes T V γ 9V δ 2.

A la suite d'une introduction qui explicite le contexte scientifique de nos recherches, les résultats que nous avons obtenus *in vitro* au cours de cette étude sont présentés sous la forme d'un article scientifique. Cette thèse se conclut par une discussion des résultats et les perspectives ouvertes aujourd'hui pour ce projet.

INTRODUCTION

I- PRINCIPAUX EFFECTEURS DE L'IMMUNITÉ ANTITUMORALE

Chez l'Homme, le système immunitaire – principal système de défense de l'organisme – comporte deux pans majeurs : l'immunité innée et l'immunité adaptative (Figure 1).

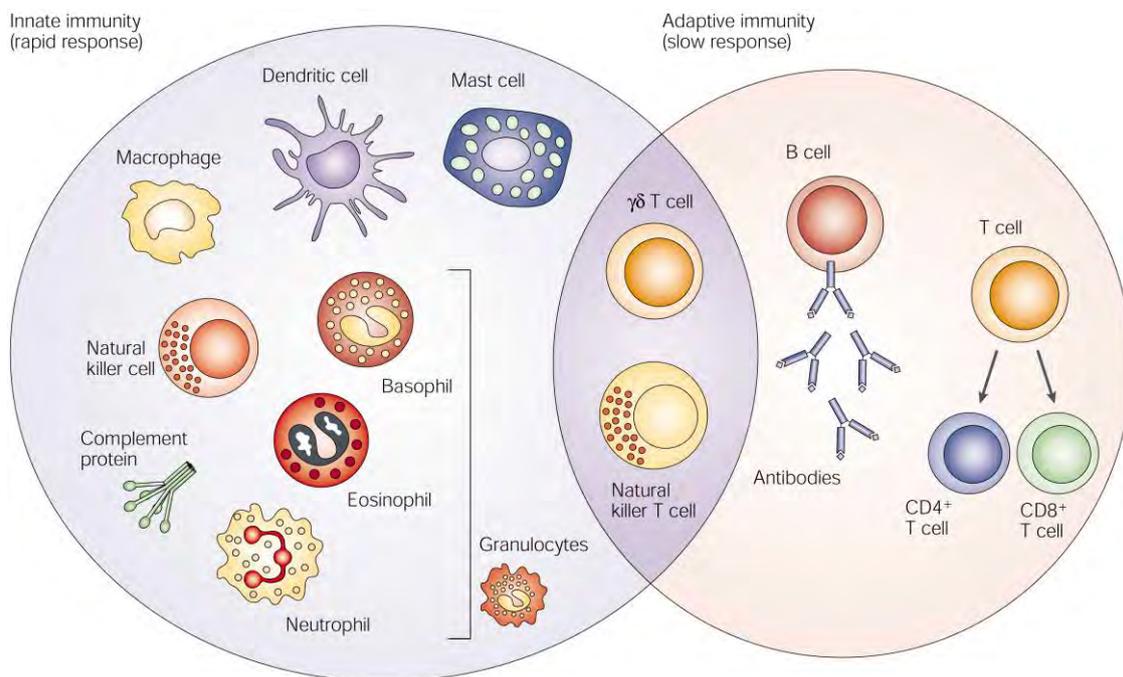


Figure 1 : Principaux composants du système immunitaire. Extrait de ¹¹.

Les cellules de l'immunité innée regroupent les cellules Natural Killer (NK), les mastocytes, les polynucléaires basophiles et les cellules phagocytaires : cellules dendritiques (DCs), macrophages et polynucléaires neutrophiles et éosinophiles. Ces cellules interviennent rapidement dans la réponse immunitaire et vont répondre de manière non spécifique contre les agents pathogènes et les cellules tumorales, reconnus comme dangereux pour l'organisme. Ce type de réponse immunitaire n'engendre pas de mémoire immunologique contre « l'agresseur ». En revanche, les cellules de l'immunité adaptative, regroupant les lymphocytes $T\alpha\beta$ et les lymphocytes B, sont conçues pour répondre spécifiquement à un antigène (Ag) donné. Cela permet d'obtenir une réponse plus efficace car entièrement dirigée contre une cible particulière. Par contre, elle est plus longue à se mettre en place. Ce type d'immunité est caractérisé par la mise en place d'une mémoire immunologique contre « l'agresseur », permettant une réponse

plus rapide si une nouvelle exposition à cet agent survient par la suite. A la frontière de ces deux pans, on retrouve les lymphocytes T non conventionnels, dont les lymphocytes $\gamma\delta$, qui possèdent des caractéristiques à la fois des cellules de l'immunité innée et de l'immunité adaptative. Ce chapitre présente succinctement les principaux effecteurs de la réponse immunitaire antitumorale. Les lymphocytes $\gamma\delta$, qui font l'objet de cette étude, seront plus longuement détaillés par la suite.

I-1- Les effecteurs de l'immunité innée

I-1-1- Les cellules dendritiques

Les DCs, qui sont des cellules présentatrices d'antigène (CPA) spécialisées, ont pour fonction de diriger les différents types de réponses des lymphocytes T dans l'organisme. Elles participent ainsi à la sélection négative dans le thymus, à la mise en place de la tolérance périphérique ou encore à l'initiation de la réponse effectrice et mémoire des lymphocytes T³⁷.

En périphérie, les DCs résident principalement dans les tissus sous un état immature où elles sont susceptibles de rencontrer des pathogènes ou des cellules transformées qu'elles peuvent identifier comme dangereux. En effet, les DCs reconnaissent des signaux de danger tels que des PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) ou des DAMPs (danger-associated molecular pattern) exprimés par les pathogènes et les cellules cancéreuses *via* leurs récepteurs PRRs (pattern-recognition receptors)¹⁴. Parmi les PRRs, les plus connus sont les TLRs (Toll-Like receptors) dont il existe différents sous-types. Par exemple, le TLR4 est sensible au lipopolysaccharide (LPS) des bactéries gram négatif mais aussi à la molécule HMGB1 (High mobility group box 1) qui est libérée dans le milieu extracellulaire lors de la mort des cellules cancéreuses^{38,39}.

Lorsque les PRRs sont activés sur les DCs, ces dernières vont endocyter l'élément dangereux et subir une phase de maturation au cours de laquelle des modifications morphologiques, phénotypiques et fonctionnelles se produisent⁴⁰. Elles perdent l'expression des récepteurs d'endocytose et des récepteurs aux chimiokines périphériques CCR1, CCR2 et CCR5. Parallèlement, elles acquièrent le récepteur d'adressage ganglionnaire CCR7. Ceci leur permet de quitter la zone inflammatoire et de recirculer dans les vaisseaux lymphatiques jusqu'aux

ganglions⁴¹. Elles apprêtent et présentent les Ags étrangers, tels que les Ags tumoraux, aux lymphocytes T circulants à l'aide des molécules du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe I et II. Elles augmentent également leur expression de molécules comme CD80/CD86 (ligands de CD28) ou CD40 (récepteur de CD40L) qui fournissent les signaux de costimulation nécessaires à l'activation efficace des lymphocytes T (Figure 2). De plus, elles sécrètent des cytokines comme l'interleukine-12 (IL-12), l'IL-4 ou l'interféron- γ (IFN- γ) et des chimiokines en grande quantité qui vont aider à la polarisation et à l'activation des lymphocytes T naïfs et des cellules NK⁴².

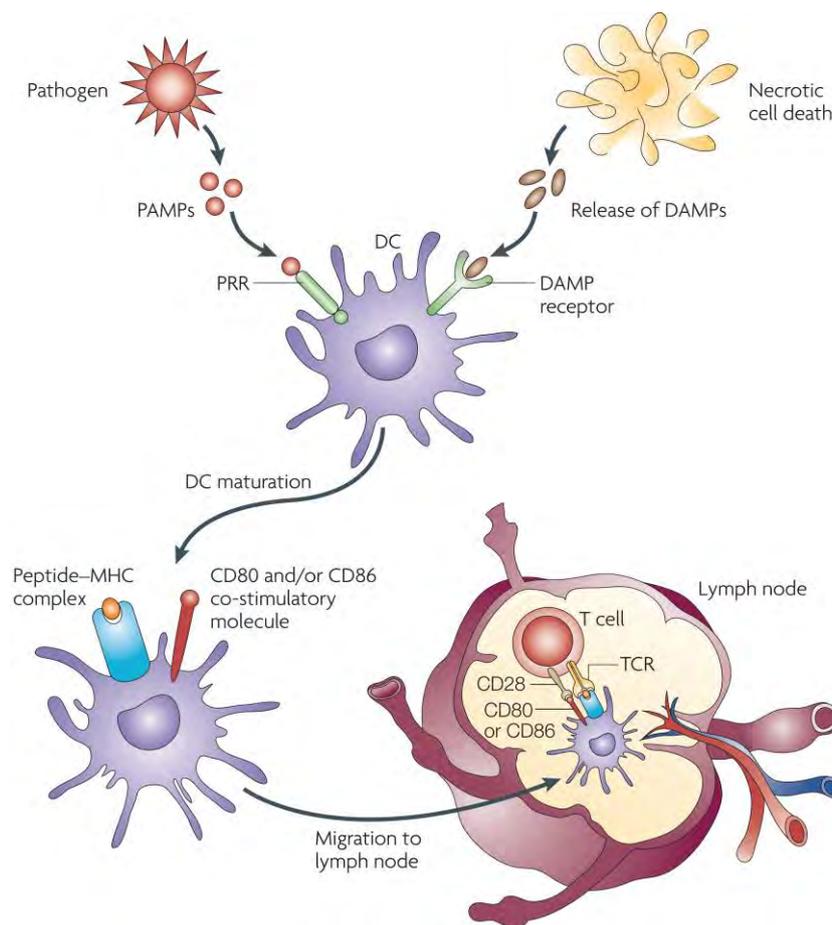


Figure 2 : Activation des DCs et présentation des Ags. Extrait de ¹⁴.

I-1-2- Les cellules NK

Les cellules NK appartiennent au groupe des cellules lymphoïdes innées (ILCs)²⁴. Elles ont la capacité de discriminer les cellules saines des cellules stressées, telles que les cellules

tumorales et les cellules infectées, et de les éliminer. Pour cela, les cellules NK expriment tout un panel de récepteurs, les NKRs (Natural Killer receptors), mais aussi des récepteurs d'adhésion et des récepteurs aux cytokines. L'intégration de l'ensemble de ces signaux par les cellules NK permet de réguler finement leur activation ou, au contraire, de maintenir la tolérance au soi²¹.

I-1-2-1- Récepteurs des cellules NK, NKRs

Les NKRs regroupent différents types de récepteurs. Par exemple, les récepteurs KIRs (Killer-cell immunoglobulin-like receptors) reconnaissent pour la plupart les molécules du CMH I classique HLA-A/B/C (Human leucocyte antigen) et peuvent délivrer des signaux activateurs ou inhibiteurs. Leurs parties extracellulaires sont constituées de 2 ou 3 domaines de type immunoglobuline (Ig). Les KIRs inhibiteurs possèdent un motif ITIM (Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif) sur leur partie intra-cytoplasmique qui est phosphorylé par les kinases Src lorsque le récepteur est lié à son ligand. En revanche, les KIRs activateurs doivent s'associer à des protéines adaptatrices comme DAP12, qui possèdent un motif ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif), pour transduire le signal activateur⁴³.

Parmi les NKRs, on retrouve aussi des récepteurs de type lectines C, comme NKG2D (Natural killer cell lectin-like receptor 2). C'est un récepteur activateur majeur des cellules NK, ayant pour ligands les molécules du CMH de classe I non classiques MICA/MICB (MHC class I polypeptide-related sequence B) et les molécules UL16-binding proteins (ULBPs). NKG2D est associé de manière non covalente avec la protéine adaptatrice DAP10 pour permettre la transduction du signal. MICA/MICB et les molécules ULBPs sont exprimées notamment en cas de stress cellulaire et peuvent apparaître sur les cellules cancéreuses ou infectées⁴⁴. Il existe aussi d'autres récepteurs de ce type comme CD94, NKG2A et NKG2C. Ces protéines sont groupées sous forme d'hétérodimères formant des récepteurs activateurs (CD94/NKG2C) ou inhibiteurs (CD94/NKG2A) qui ont pour ligand la molécule de CMH I non classique HLA-E, pouvant être exprimée à la surface de diverses cellules infectées ou cancéreuses⁴⁵.

Les NKRs comprennent aussi les NCRs (Natural cytotoxicity receptors) NKp30, NKp44 et NKp46. Ces récepteurs activateurs ont aussi besoin de molécules adaptatrices comme CD3 ζ ou DAP12 possédant un motif ITAM pour la transduction du signal⁴⁶.

I-1-2-2- Fonctions antitumorales

Pour comprendre comment les cellules NK sont activées par les cellules tumorales, il faut déjà comprendre comment la tolérance au soi est maintenue en condition physiologique. Lorsque les cellules NK rencontrent des cellules saines, les signaux activateurs qu'elles rencontrent sont annulés par l'engagement des récepteurs inhibiteurs par les molécules du CMH I classique. Dans ce cas, les cellules NK ne sont pas activées (Figure 3a)²¹.

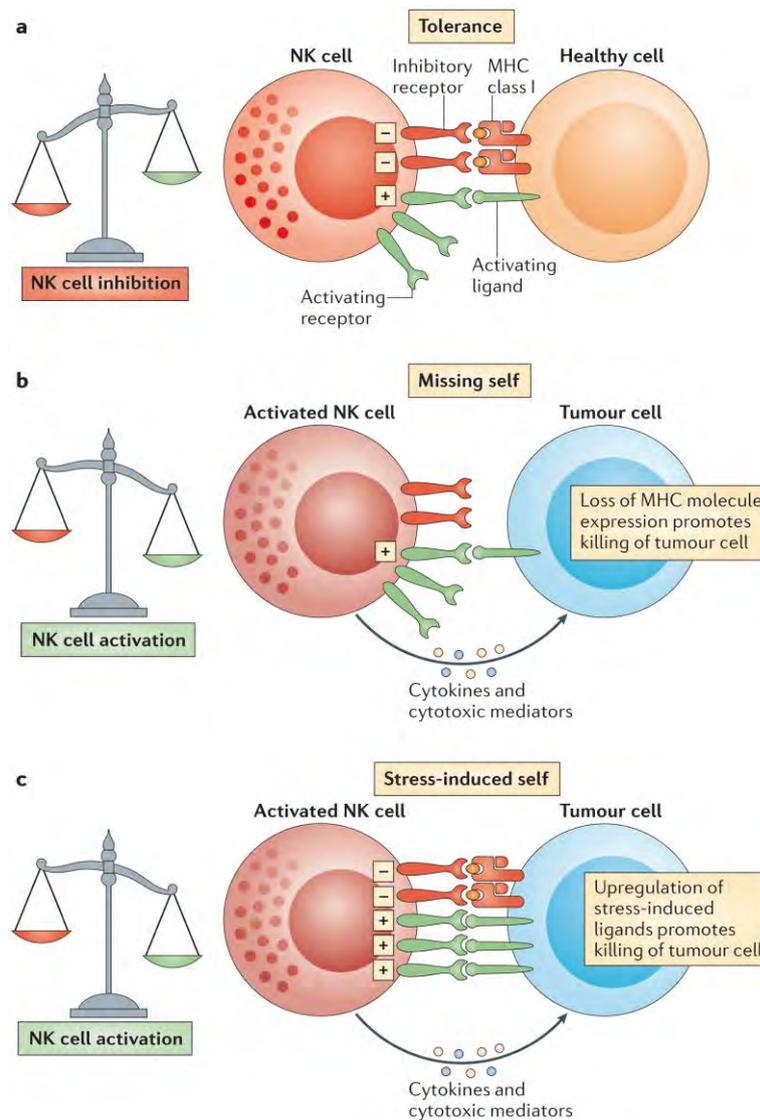


Figure 3 : Activation des cellules NK par les cellules tumorales. Extrait de ²¹.

Selon la théorie du « missing-self », les cellules NK peuvent être activées en raison de la perte d'expression des molécules du CMH I classique, fréquente sur les cellules tumorales. Dans ce cas, les NKRs inhibiteurs ne sont plus engagés et il y a rupture de la tolérance (Figure 3b)²¹.

Cependant, toutes les cellules transformées ne perdent pas l'expression des molécules du CMH I classique. En revanche, comme nous l'avons vu plus haut, elles expriment très souvent des molécules de stress comme MICA/MICB, les molécules ULBPs, HLA-E, HLA-G... qui sont des ligands des récepteurs activateurs des cellules NK. Dans ce cas, les signaux activateurs deviennent prépondérants par rapport aux signaux inhibiteurs et les cellules NK sont activées (Figure 3c)²¹.

Lorsqu'elles sont activées par les cellules tumorales, les cellules NK peuvent les éliminer par différents moyens. D'une part, elles sécrètent des cytokines pro-inflammatoires, dont l'IFN- γ et le TNF- α (Tumor necrosis factor), et des granules lytiques contenant de la perforine et des granzymes. Elles expriment aussi TRAIL (Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand) qui est un ligand des récepteurs de mort DR4/DR5 exprimés par les cellules cancéreuses et FasL (CD95L)⁴⁷. Ces facteurs ont un effet cytotoxique direct sur les cellules tumorales. Tous ces mécanismes de cytotoxicité sont détaillés dans le paragraphe concernant la toxicité cellulaire des lymphocytes T $\gamma\delta$ (*cf II-4- Propriétés atumorales des lymphocytes T V γ 9V δ 2*).

D'autre part, les cellules NK sont aussi impliquées indirectement dans la lutte contre les cellules cancéreuses. L'IFN- γ qu'elles sécrètent participe à l'activation des autres cellules du système immunitaire, ce qui amplifie la réponse antitumorale. De plus, ces cellules participent au phénomène d'ADCC (cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps)⁴⁸. Ce mécanisme de toxicité implique les récepteurs FcRs, récepteurs du fragment Fc des anticorps (Ac). Ils sont au nombre de six : Fc γ RI (CD64), Fc γ RIIA (CD32A), Fc γ RIIB (CD32B), Fc γ RIIC (CD32C), Fc γ RIIIA (CD16A) et Fc γ RIIIB (CD16B). Les cellules NK expriment le CD32C, le CD16A et le CD16B⁴⁹. Donc, en présence d'Ac dont le fragment constant est reconnu par ces récepteurs, un pontage s'effectue entre la cellule cible de l'Ac et les cellules NK. Ces derniers vont alors exocytter leurs granules cytotoxiques et provoquer la lyse de la cellule cible²⁶.

I-2- Les cellules de l'immunité adaptative

I-2-1- Les lymphocytes T CD4

Les lymphocytes T CD4, aussi appelés T helpers (Th), sont des acteurs essentiels des réponses immunitaires adaptatives. Leur activation dépend de la reconnaissance par leur TCR

(T cell receptor) d'un Ag spécifique présenté par une CPA à l'aide des molécules du CMH de classe II. Cette stimulation du TCR représente le premier signal d'activation des lymphocytes T CD4, mais n'est pas suffisante pour obtenir une réelle activation de ces cellules. En effet, d'autres signaux, dits signaux de costimulation, sont nécessaires pour obtenir une activation effective et leur absence entraîne l'anergie des lymphocytes T CD4. Le principal signal de costimulation est fourni par l'interaction de CD80/CD86 exprimés sur les CPA avec la molécule CD28 présente sur les lymphocytes T CD4. De plus, la molécule CD4 interagit avec les molécules du CMH pour stabiliser la synapse, ce qui augmente le temps d'interaction avec les CPA et donc leur activation. En retour, les lymphocytes T CD4 activés expriment la molécule CD40L qui interagit avec la molécule CD40 des CPA, ce qui provoque une augmentation de l'expression de CD80/CD86 sur ces dernières. A la suite de leur activation, les lymphocytes T CD4 subissent une phase d'expansion clonale et de maturation pendant laquelle ils acquièrent leurs fonctions effectrices⁷.

Il existe différentes sous-populations de lymphocytes T CD4, caractérisées par des fonctions effectrices spécifiques. La polarisation des lymphocytes T CD4 naïfs vers un sous-type particulier se fait sous le contrôle strict d'un facteur de transcription, spécifique selon le sous-type considéré. L'expression de ce facteur de transcription est elle-même régulée en fonction de différents facteurs, parmi lesquels l'environnement cytokinique au moment de l'activation du lymphocyte T CD4, qui joue un rôle prépondérant. Ainsi, les lymphocytes T CD4 naïfs peuvent se différencier en différents sous-types comme les Th1 ou les Th2 ²²(Figure 4).

Parmi ces sous-populations, les plus représentées dans les réponses inflammatoires sont les lymphocytes Th1 et Th2. Les lymphocytes T CD4 naïfs se polarisent en Th1 sous l'influence de l'IL-12 et de l'IFN- γ et vont exprimer le facteur de transcription T-bet. Ils sécrètent principalement de l'IFN- γ et du TNF- α et participent à l'activation des lymphocytes T CD8 et des macrophages. On parle alors de réponse immune de type Th1. Pour leur part, les lymphocytes Th2 sont polarisés par l'IL-4 et expriment le facteur de transcription GATA-3. Ils sécrètent de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13 et participent ainsi à l'immunité humorale anti-helminthe en favorisant la sécrétion d'Ig, notamment des IgE. Dans ce cas là, on parle de réponse immune de type Th2. Ces deux sous-types sont mutuellement exclusifs puisque l'IL-12 inhibe la différenciation de lymphocytes Th2 tandis que l'IL-4 inhibe celle des Th1⁵⁰.

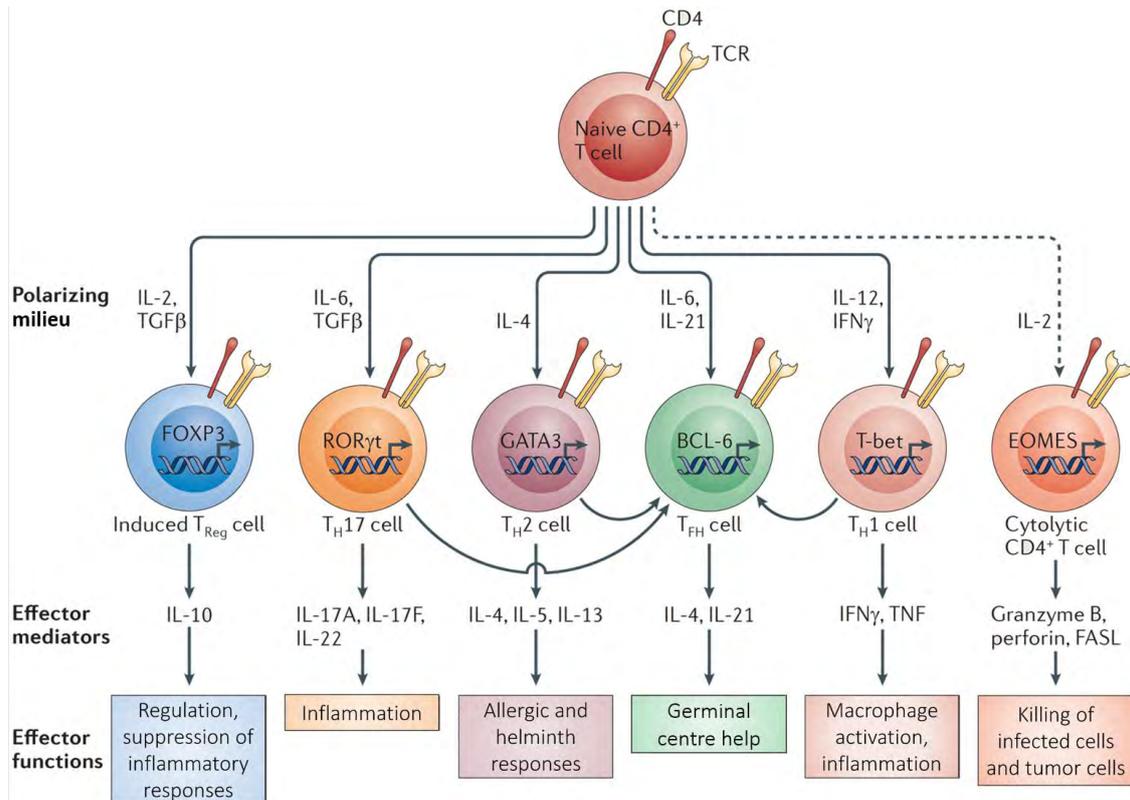


Figure 4 : Les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4. Modifié depuis ²².

Il existe une sous-population particulière de lymphocytes T CD4 qui possèdent des fonctions cytolytiques. Ces lymphocytes T CD4 cytotoxiques se développeraient plutôt dans la phase initiale du développement de la tumeur et disparaîtraient au cours du développement tumoral. Ces lymphocytes sécrètent des cytokines de type IFN- γ et TNF- α et des granules lytiques contenant de la perforine et des granzymes, qui tuent directement les cellules tumorales. De plus, ils peuvent aussi cibler les cellules cancéreuses par la voie Fas/FasL, bien que ce ne soit pas le mécanisme d'induction principal de la mort pour les lymphocytes T CD4 humains⁵¹. Leur présence a notamment été confirmée dans un modèle de leucémie érythroblastique chez la souris⁵² et chez des patients atteints de tumeurs du sein^{53,54} et d'hépatocarcinome⁵⁵.

I-2-2- Les lymphocytes T CD8

La principale fonction des lymphocytes T CD8 dans l'immunité antitumorale est de reconnaître et de détruire les cellules cancéreuses. Pour cela, les lymphocytes T CD8 naïfs doivent rencontrer leur Ag spécifique présenté par les molécules du CMH de classe I, soit par les cellules cancéreuses, soit par les CPA du système immunitaire. Cette activation leur permet

d'acquérir leurs fonctions de lymphocytes T cytotoxiques (CTLs). Leur activation requière également des signaux de costimulation, qui peuvent être fournis par les CPA *via* l'interaction de CD80/CD86 avec CD28, soit par l'interaction CD40-CD40L avec les lymphocytes T CD4⁵⁶. Cette dernière n'est pas absolument nécessaire à leur activation, mais elle renforce grandement leurs fonctionnalités⁵⁷. De plus, cette interaction avec les lymphocytes T CD4 est nécessaire à l'établissement de la réponse mémoire des CTLs^{58,59}.

Ils possèdent deux principaux mécanismes d'induction de mort : l'exocytose de granules lytiques contenant de la perforine et des granzymes et l'activation des voies des récepteurs de mort *via* FasL et TRAIL⁵⁶. Ces mécanismes seront détaillés plus loin dans le chapitre concernant les propriétés antitumorales des lymphocytes T V γ 9V δ 2.

D'autres cellules interviennent également dans la réponse antitumorale. C'est notamment le cas des lymphocytes T γ δ faisant l'objet de cette étude et développés dans le chapitre suivant.

II- LES LYMPHOCYTES T $\gamma\delta$

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont des lymphocytes T non conventionnels nommés ainsi par analogie avec leurs confrères, les lymphocytes T $\alpha\beta$, en fonction de la structure de leur TCR composé d'une chaîne γ et d'une chaîne δ . Ils se situent à la frontière de l'immunité innée et adaptative car ils partagent des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles à la fois des cellules NK et des lymphocytes T $\alpha\beta$ (Figure 1). Bien que minoritaires parmi les autres cellules immunitaires, leur vaste capacité de reconnaissance antigénique et leur très grande diversité fonctionnelle en font des acteurs majeurs dans les réponses immunitaires anti-infectieuses et antitumorales.

II-1- Répertoire et fonctionnalités

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont les premiers lymphocytes à se développer au cours de la vie foetale. Ils apparaissent tout d'abord dans le foie et l'intestin foetal entre la 7^{ème} et la 11^{ème} semaine de gestation puis ils colonisent le thymus par vagues successives à partir de la 10^{ème} semaine. Ensuite, un tropisme s'établit avec la colonisation d'un organe donné par une sous-population de lymphocytes T $\gamma\delta$ donnée^{60,61} (Figure 5).

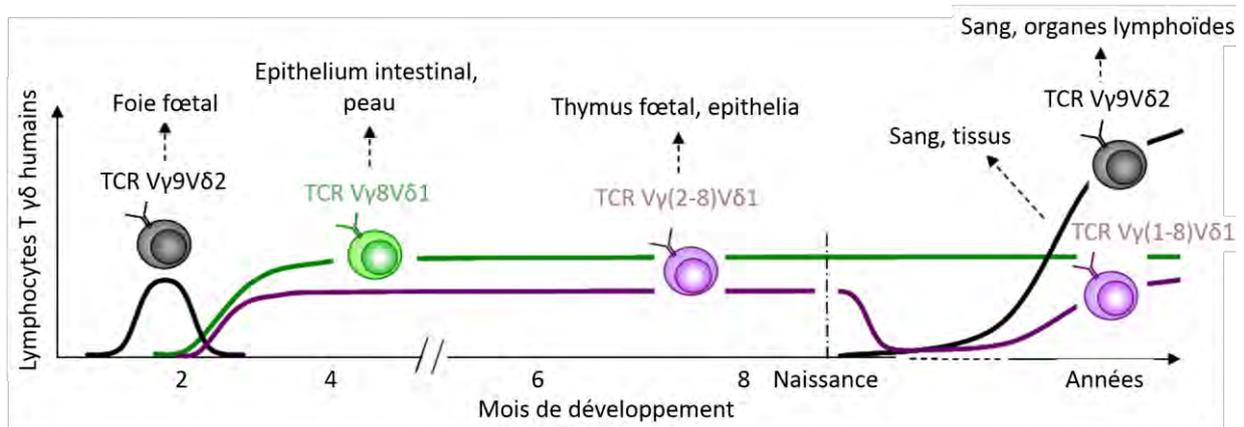


Figure 5 : Vagues de développement des lymphocytes T $\gamma\delta$ chez l'Homme.

Les proportions des différentes sous-populations de lymphocytes T $\gamma\delta$ varient selon l'espèce et l'organe considéré. Par exemple, la sous-population TCR V γ 9V δ 2 n'est présente que chez les humains et les autres primates représentant seulement 1 à 5% des cellules

mononucléées du sang périphérique (PBMCs), soit 80% des $T\gamma\delta$ circulants, tandis que les lymphocytes T $V\delta 1$ peuvent atteindre jusqu'à 50% des lymphocytes T de la barrière intestinale.

II-1-1- Répertoire

Comme pour les lymphocytes $T\alpha\beta$, la diversité du TCR des lymphocytes $T\gamma\delta$ est générée par la recombinaison somatique aléatoire de différents segments de gènes codant pour les chaînes γ et δ . Cette recombinaison est réalisée par les recombinases codées par les gènes *RAG1* (Recombination activating gene) et *RAG2*. Ces enzymes vont permettre d'obtenir des gènes fonctionnels à partir de segments V (Variable), D (Diversité), J (Jonctionnel), et C (Constant). Le gène codant pour la chaîne γ est constitué d'un segment V et d'un segment J tandis que celui codant pour la chaîne δ se compose des segments V, D et J (Figure 6). Le segment C sera ensuite ajouté à ces deux gènes au moment de l'épissage post-transcriptionnel³⁵.

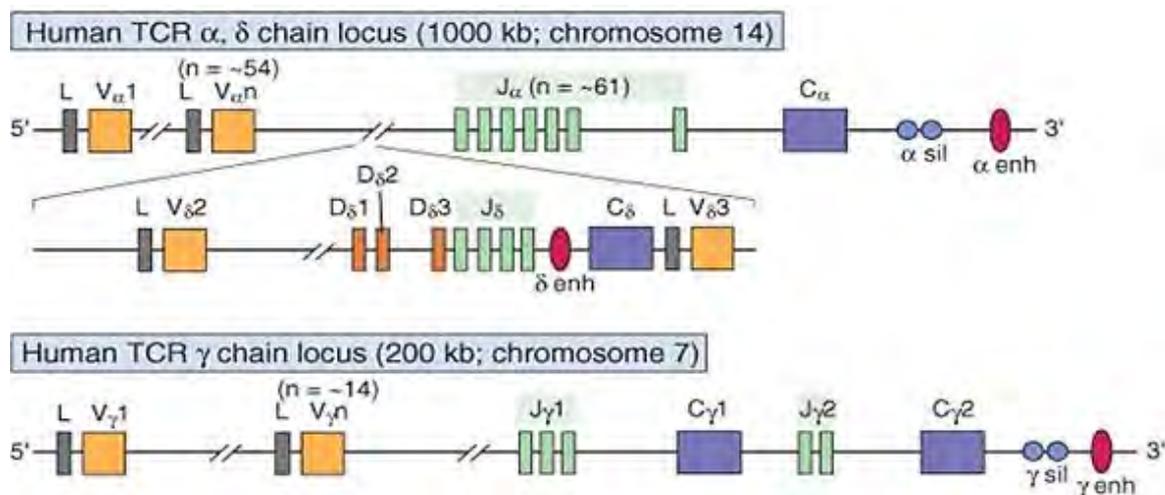


Figure 6 : Organisation des loci des gènes du TCR humain. Extrait de ⁷.

Bien qu'il existe beaucoup moins de segments γ et δ que de segments α et β , la diversité du TCR $\gamma\delta$ est potentiellement plus importante que celle du TCR $\alpha\beta$. Ceci est dû en partie à l'insertion de nucléotides au niveau des jonctions des différents segments V, D, J lors de la recombinaison somatique. Cependant, cette très grande diversité n'est jamais atteinte. Au contraire, la structure du TCR $\gamma\delta$ est très conservée et cette diversité théorique est perdue au profit d'une oligoclonalité. Ainsi, chaque réarrangement préférentiel au niveau des gènes codant

les chaînes du TCR constitue une sous-population aux caractéristiques fonctionnelles particulières³⁵ (Table 1).

$\gamma\delta$ T-cell population (origin)	Antigen specificity	Functional phenotype	Biological function
Mouse			
V γ 1-V δ 6/4 (spleen, liver, thymus T-cell hybridomas; naïve and pathogen-infected mice)	Mycobacterial Hsp60/Hsp60 ₁₈₀₋₁₈₇	Cytokine release (T _H 1)	Modulation of innate and adaptive antigen-specific immune responses
V γ 2-V δ 5 (clone LBK5)	I-E*	Cytokine release	?
V γ 2-V δ 8 (clone Tg14.4)	HSV-g1 (N terminus)	Cytotoxicity, cytokine release (IFN- γ)	Protection from lethal virus infection
V γ 2-V δ 5 (hybridoma KN6)	T10/22 (MHC class Ib)	Cytotoxicity, cytokine release	Immune surveillance?
V γ 2-V α 11.3 (hybridoma G8)	T10/22	Cytotoxicity, cytokine release	Immune surveillance?
V γ 5-V δ 1 (DETC lines)	Stressed epithelial cells?	Cytotoxicity and cytokine/chemokines; KGF release modulated by co-receptors	Regulation of epithelial integrity/turnover; elimination of stressed/transformed cells; regulation of CMI responses
V γ 7 (iIEL lines)	Stressed epithelial cells?	Cytotoxicity; suppression; KGF and T _H 1 cytokine release modulated by co-receptors	Induction/maintenance of IgA responses; induction/maintenance of oral tolerance; regulation of epithelial-cell turnover
Human			
V γ X-V δ 1 (iIEL lines and clones)	MICA, MICB	Cytotoxicity	Elimination of stressed/transformed cells
V γ X-V δ 1 (LA, synovial fluid clones)	Lipohexapeptides + DC + IL-2	?	Fas-mediated modulation of immune response to infection
V γ ?-V δ 1 (PB clones)	HLA-A2, HLA-A24	Cytotoxicity, T _H 1 cytokine release	?
V γ X-V δ 1 (PB clones)	CD1c	Cytotoxicity	?
V γ 9-V δ 2 (PB clones)	Organic phosphoesters, alkylamines, nucleotide-conjugates and cell-cell contact	Cytotoxicity, T _H 1 cytokine release	Unique role in immunity to infection, homeostatic control of immune and non-immune processes?
V γ 9-V δ 2 (TL, PB clone)	Pamidronate + monocytic APCs	Cytotoxicity, IFN- γ release	Elimination of myeloid-cell targets?
V γ 9-V δ 2/1 (PB clones)	SEA	Cytotoxicity	Anti-microbial immunity?
V γ 9-V δ 2 (RA, synovial fluid)	Mycobacterial Hsp65 ₁₈₀₋₁₈₆ /tetanus toxoid ₁₂₂₋₁₂₆₂ + HLA-DRw53	Cytotoxicity	Eliminate autoreactive cells?
V γ 9-V δ 2 (PB lines and clones)	GroEL homologue on Burkitts lymphoma cells	Cytotoxicity, cytokine release	Tumour surveillance?

Table 1 : Les différentes sous-populations de lymphocytes T $\gamma\delta$ et leurs fonctions biologiques. Extrait de ³⁵.

APC, antigen-presenting cell ; CMI, cell-mediated immunity ; DC, dendritic cell ; DETC, dendritic epidermal T cell ; GRoEL, heat-shock 60 kD protein 1 ; HLA, human leukocyte antigen ; Hsp, heat-shock protein ; HSV-g1, herpes simplex virus glycoprotein 1 ; I-Ek, MHC class II gene, E ; iIEL, intestinal intraepithelial lymphocyte ; KGF, keratinocyte growth factor ; LA, Lyme arthritis ; PB, peripheral blood ; RA, rheumatoid arthritis ; SEA, staphylococcal enterotoxin A ; Tg, transgenic ; TH cell, T-helper cell ; TL, tuberculoid leprosy ; ?, not known.

II-1-2- Fonctionnalités

II-1-2-1- Pléiotropie fonctionnelle et plasticité cellulaire

Comme explicité précédemment, une sous-population donnée de lymphocytes T $\gamma\delta$ exerce des fonctions cellulaires restreintes liées à sa localisation tissulaire, sa réactivité

antigénique et au contexte infectieux ou inflammatoire local. Cette spécialisation est due à la fois à leur programmation cellulaire initiale mais aussi à leur plasticité fonctionnelle en périphérie, c'est-à-dire leur capacité à intégrer différents signaux de stress cellulaire pour produire une réponse immune adaptée. Par exemple, les lymphocytes T V γ 9V δ 2 se polarisent préférentiellement vers un phénotype Th1, caractérisé par la sécrétion d'IFN- γ et de TNF- α et une cytotoxicité cellulaire dirigée contre leur cible. Cependant, sous l'influence de signaux environnementaux, ils peuvent être polarisés en cellules Th2, Th17...³¹

II-1-2-2- Fonctions effectrices

Les lymphocytes T γ δ exercent des fonctions très variées dans l'organisme. Bien que la diversité de leur TCR soit restreinte, ces cellules sont capables de reconnaître des Ags de natures très différentes et ce, sans présentation par les molécules du CMH⁶². Suite à cette activation, les lymphocytes T γ δ vont pouvoir répondre de manière très rapide sans nécessité d'une expansion clonale préalable. D'autre part, ils sont également activés par des molécules liées aux stress cellulaires grâce aux TLRs et aux NKR dont NKG2D, qui tient une place majeure dans la régulation de l'activation des lymphocytes T γ δ . Ces caractéristiques leur permettent d'intervenir dans les stades précoces de la réponse immune, bien avant la mise en place de la réponse adaptative^{63,64}.

En fonction de leur polarisation, les lymphocytes T γ δ peuvent être impliqués dans les réponses immunitaires contre les bactéries, les virus et les parasites et dans la surveillance antitumorale, *via* la sécrétion de différentes cytokines (IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-13...), chimiokines [Macrophage Inflammatory Proteins MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted)] et grâce à leurs fonctions cytotoxiques (granules lytiques, FasL, TRAIL...).

De manière intéressante, les lymphocytes T γ δ peuvent également mimer le rôle des CPA spécialisées comme les DCs, initiant ainsi la réponse immune adaptative. En effet, lorsqu'ils sont activés par un phosphoantigène (PAg), les lymphocytes T V γ 9V δ 2 augmentent leur expression de molécules du CMH de classe II HLA-DR, de costimulation CD80, CD86, CD40 et de molécules d'adhésion comme ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1)⁶⁵. De plus, les lymphocytes T γ δ stimulés par des extraits protéiques de *Mycobacterium tuberculosis* puis mis en co-culture avec

des lymphocytes T CD4 ou T CD8 naïfs induisent une forte prolifération de ces lymphocytes T $\alpha\beta$ ^{65,66} lié à un phénomène de cross-présentation antigénique⁶⁷. Le taux de lymphocytes T $\alpha\beta$ spécifiquement répondeurs est fortement augmenté lorsque les cellules cibles des lymphocytes T $\gamma\delta$ sont opsonisées⁶⁸.

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ régulateurs

Des sous-populations de lymphocytes T $\gamma\delta$ peuvent également posséder des fonctions immunosuppressives comme leurs analogues les lymphocytes Tregs. Ils ont été identifiés pour la première fois chez la souris en 2009 par Kang et ses collaborateurs⁶⁹. Depuis, plusieurs études ont montré l'existence des T $\gamma\delta$ régulateurs chez l'Homme, parmi les V δ 2 et les V δ 1⁷⁰⁻⁷². Ces cellules inhibent la prolifération des lymphocytes T $\alpha\beta$ notamment *via* la sécrétion de TGF- β (Transforming growth factor β). Plus récemment, un autre mécanisme d'action de ces cellules régulatrices a été mis en évidence. Des lymphocytes T $\gamma\delta$ purifiés mis en co-culture avec des lymphocytes T CD4⁺ CD25⁻ stimulés par des Ac anti-CD2, anti-CD3 et anti-CD28 inhibent l'activation de ces lymphocytes T CD4. Le blocage de l'interaction CD86/CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) restaure la prolifération des lymphocytes T CD4 montrant que ce mécanisme pourrait être responsable de cette inhibition⁷³.

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ 17

Les cytokines de la famille IL-17 (IL-17A-F) sont des cytokines pro-inflammatoires ayant un très large spectre d'action. Au sein de ce groupe, l'IL-17A est la plus étudiée⁷⁴. Les cellules productrices d'IL-17A les plus connues sont les lymphocytes T CD4⁺ IL-17⁺ Th17. Cependant, bien d'autres cellules du système immunitaire peuvent en produire et notamment les lymphocytes T $\gamma\delta$. Ils sont alors appelés T $\gamma\delta$ 17 ou T17.

Etant donné que l'IL-17 possède un très large spectre d'action, beaucoup d'études se sont intéressées à son rôle en cancérologie. Il apparait que la présence d'IL-17 dans le microenvironnement tumoral est à double tranchant car elle possède à la fois une action pro- et antitumorale⁷⁵. Par exemple, il a été montré que l'IL-17 peut améliorer l'immunité spécifique antitumorale en augmentant l'activité des CTLs⁷⁶ et en induisant la maturation des DCs qui expriment plus de CMH de classe I et II⁷⁷. Pourtant, de nombreux travaux décrivent l'IL-17

comme un facteur favorisant le développement tumoral du fait de son action pro-angiogénique. L'IL-17 agit sur les cellules stromales et les cellules endothéliales, ce qui induit la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques dont le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)⁷⁸, l'IL-6, l'IL-8, CXCL1, CXCL5 et CXCL6. Ces facteurs sont aussi connus pour stimuler l'angiogenèse, la prolifération et la survie des cellules cancéreuses ainsi que la dissémination tumorale^{81,82}.

Plusieurs études ont montré que les lymphocytes T $\gamma\delta$ peuvent représenter une source importante voire majoritaire d'IL-17 dans le microenvironnement tumoral^{83,86,87}. Dans une étude menée sur quatre modèles tumoraux chez la souris, Ma et ses collaborateurs ont montré que les T $\gamma\delta$ 17 sont essentiels à l'efficacité des chimiothérapies par anthracyclines car ils participent à la mise en place de la réponse T spécifique liée à la mort immunogénique des cellules cancéreuses⁸⁸. De plus, *via* le chimiotactisme qu'ils exercent sur les neutrophiles, les T $\gamma\delta$ 17 sont impliqués dans l'efficacité des injections de BCG (bacille de Calmette et Guérin) comme traitement adjuvant du cancer vésical⁸⁹. Mais les lymphocytes T $\gamma\delta$ 17 possèdent aussi une activité pro-tumorale liée à l'action de l'IL-17 sur les cellules stromales et les cellules cancéreuses. Récemment, dans un modèle d'hépatocarcinome murin, des chercheurs ont montré que les T $\gamma\delta$ 17 sont responsables de l'infiltration de cellules myéloïdes immunosuppressives (MDSCs) dans la tumeur. Ces cellules vont, par la sécrétion d'IL-1 β et d'IL-23, favoriser le développement des T $\gamma\delta$ 17, créant ainsi une boucle en faveur du développement tumoral⁸⁵. Une autre étude récente menée par le groupe de Bruno Silva-Santos illustre cette dynamique des T $\gamma\delta$ 17 dans le microenvironnement tumoral. Dans leur modèle de cancer ovarien avec une forte composante inflammatoire, ils observent une disparition progressive des T $\gamma\delta$ producteurs d'IFN- γ au profit des T $\gamma\delta$ 17 au cours du développement tumoral. Les T $\gamma\delta$ 17 favorisent le recrutement de macrophages qui vont promouvoir l'angiogenèse et la croissance des cellules tumorales *via* l'expression de gènes codant pour l'IL-1 β , l'IL-6, le VEGF, le TGF- β , CXCL1 et CXCL8⁸⁶.

L'ensemble de ces résultats obtenus dans des modèles murins trouvent écho dans une récente étude clinique impliquant des patients atteints de cancers colorectaux. Cette étude montre que chez ces patients, au sein de la tumeur, les T $\gamma\delta$ 17 constituent la source majeure d'IL-17. Leur développement serait dû à la présence de DCs inflammatoires dans les lésions tumorales, induisant les T $\gamma\delta$ 17 à produire de l'IL-8, du TNF- α et du GM-CSF (Granulocyte

Macrophage-Colony Stimulating Factor) avec pour résultat une accumulation de MDSCs dans la tumeur. L'infiltration des $\gamma\delta 17$ corrèle parfaitement avec le grade de la maladie ainsi qu'avec d'autres signes clinico-pathologiques comme le taux d'Ag carcino-embryonnaire (CEA)⁸⁷.

Régulation de la réponse immune par les lymphocytes $\gamma\delta$

Les lymphocytes $\gamma\delta$ exercent un rôle régulateur à tous les stades de la réponse immune en raison des nombreuses interactions qu'ils développent auprès des autres cellules du système immunitaire, détaillées dans la Figure 7.

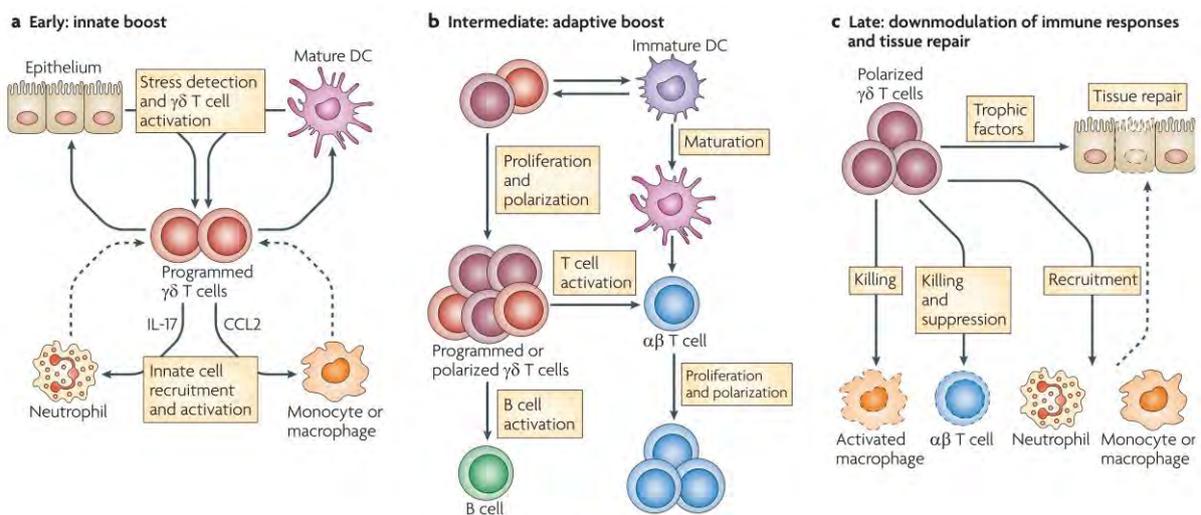


Figure 7 : Fonctions régulatrices des lymphocytes $\gamma\delta$ aux différents stades de la réponse immunitaire. Extrait de ³¹.

Dans la suite de cet exposé, nous concentrerons notre attention principalement sur les lymphocytes $T V\gamma 9V\delta 2$ qui sont l'objet principal de cette étude.

II-2- Sous-populations de lymphocytes $T V\gamma 9V\delta 2$

Parmi les lymphocytes $T V\gamma 9V\delta 2$, on peut distinguer quatre sous-populations cellulaires en fonction de l'expression des marqueurs CD27 et CD45RA. Ces sous-populations reflètent différents états de maturation où les lymphocytes $T V\gamma 9V\delta 2$ se distinguent par l'expression de leurs marqueurs de surface, leur localisation dans l'organisme et par leurs fonctions effectrices.

Les cellules **naïves** (T_N) de phénotype $CD27^+$, $CD45RA^+$ expriment fortement les récepteurs CCR7 et $CD62L^2$. Elles sont localisées majoritairement dans les ganglions

lymphatiques. Ces cellules ne possèdent pas de fonction effectrice mais sont dotées d'une grande capacité de prolifération.

Les cellules **centrales mémoires** (T_{CM}) sont de phénotype $CD27^+$, $CD45RA^-$ ², et proviennent de la maturation des cellules T_N après stimulation antigénique³. Elles sont également retrouvées dans les ganglions lymphatiques mais sont beaucoup plus nombreuses dans le sang circulant. Ces cellules expriment faiblement CCR7 et fortement CD62L. Elles acquièrent aussi les récepteurs aux chimiokines CCR5 et CXCR3 qui leur permettent de migrer aux sites inflammatoires, ainsi que CD45RO, marqueur d'un phénotype mémoire². Les cellules T_{CM} sont essentiellement capables de proliférer en réponse à la stimulation par un Ag et des signaux mitogènes tels que l'IL-2, l'IL-7 ou l'IL-15³. Le marqueur CXCR5 permet de distinguer deux sous-populations parmi les cellules T_{CM} . Les cellules $CXCR5^+$ expriment également les molécules de costimulation CD40L et ICOS (Inducible T-cell COStimulator). Elles produisent de l'IL-2, de l'IL-4 et de l'IL-10 et aident à la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes. En revanche, les $T_{CM} CXCR5^-$ sont $CD40L^-$, $ICOS^-$, ne sécrètent pas de cytokines et n'interagissent pas avec les lymphocytes B⁴.

Les cellules de type **effecteur mémoire** (T_{EM}) sont double négatives pour CD27 et CD45RA et expriment fortement les récepteurs aux chimiokines pro-inflammatoires CXCR3, CCR2, CCR5 ainsi que CD45RO. Ces cellules expriment faiblement le récepteur FcγRIIIA (CD16A) et les NKRs⁵. Bien que présentes dans le sang circulant, elles sont essentiellement retrouvées aux sites inflammatoires. Les T_{EM} ont une faible capacité de prolifération. Elles produisent peu de perforine, marquant une activité cytolytique faible mais sont fortement productrices de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN-γ et le TNF-α².

Les lymphocytes T $V\gamma 9V\delta 2$ **effecteurs mémoire terminaux** (T_{EMRA}) ont un phénotype $CD27^-$, $CD45RA^+$. Ces cellules sont retrouvées en très grande majorité sur les sites inflammatoires². Ces cellules portent le récepteur CD45RO mais contrairement aux T_{CM} , elles expriment peu de récepteurs aux chimiokines. Elles se distinguent également des T_{CM} par une forte expression du CD16 ainsi qu'une expression constitutive des NKRs. Les cellules T_{EMRA} sont réfractaires aux PAgS mais répondent après activation *via* le CD16. Elles ont une activité cytotoxique importante envers certaines bactéries et cellules tumorales, notamment due à un

fort taux de perforine. Elles produisent également des cytokines pro-inflammatoires mais moins que les T_{EM}⁵.

Il a été proposé lors de la description de ces différents états cellulaires que ces quatre phénotypes se succèderaient suivant l'état de maturation de la cellule dans l'ordre :

$$T_N \rightarrow T_{CM} \rightarrow T_{EM} \rightarrow T_{EMRA}^2.$$

Cependant, Caccamo et ses collègues ont montré que des cellules T_{CM} isolées dans le sang périphérique et cultivées avec de l'IL-15 pouvaient aboutir à deux états de maturation, T_{EM} ou T_{EMRA}. Dans cette étude, les cellules T_{EM} obtenues sont fortement productrices d'IFN-γ et de TNF-α tandis que les T_{EMRA} ont une forte capacité cytotoxique, ce qui correspond aux fonctions attendues pour ces sous-types cellulaires³. Cela laisse penser que les lymphocytes T Vγ9Vδ2 évoluent plutôt selon le schéma de maturation décrit dans la figure 8.

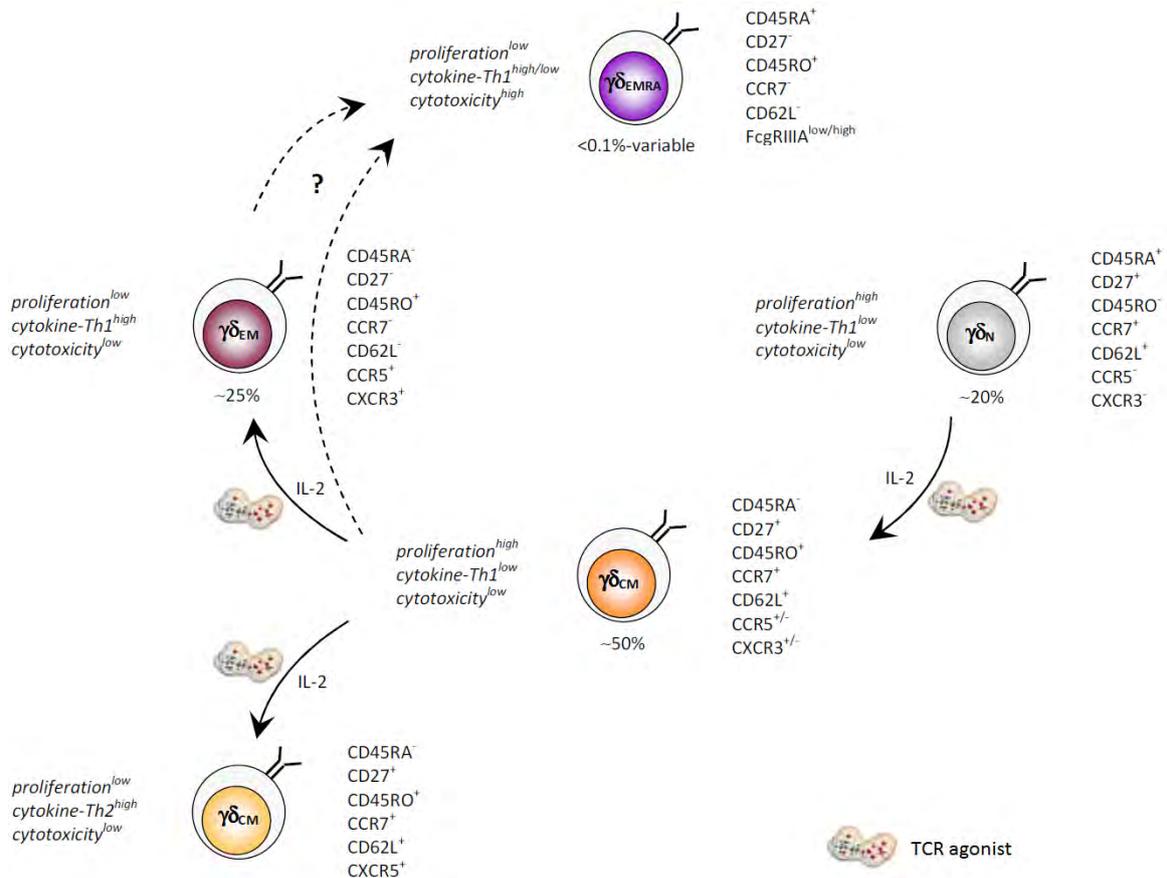


Figure 8 : Les différentes sous-populations des lymphocytes T Vγ9Vδ2. Modifié à partir de²⁻⁵.

II-3- Réactivité des lymphocytes T V γ 9V δ 2

A la suite de leur découverte, les lymphocytes T V γ 9V δ 2 se sont rapidement avérés être impliqués dans la réponse immunitaire aux mycobactéries^{90,91} et aux cellules tumorales humaines telles que les lymphomes de Burkitt⁹². Les études menées pour identifier les molécules activatrices des lymphocytes T V γ 9V δ 2 dans les mycobactéries ou les cellules cancéreuses ont permis de mettre en évidence un panel de ligands ayant pour cibles différents récepteurs à la surface de ces lymphocytes.

II-3-1- Les phosphoantigènes

II-3-1-1- Nature des phosphoantigènes

Pour comprendre comment les lymphocytes T V γ 9V δ 2 sont activés lors d'infections aux mycobactéries, les chercheurs ont évalué la réactivité de ces lymphocytes à différents extraits de *Mycobacterium tuberculosis*. Ces études ont permis d'isoler quatre Ags non peptidiques phosphorylés dénommés TUBag 1-4⁹³ (Figure 9).

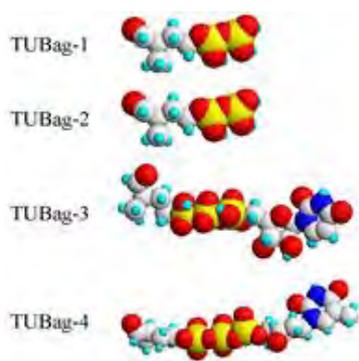


Figure 9 : Premiers PAg isolés à partir de *M. tuberculosis*. Extrait de⁹.

Par la suite, de nombreuses autres molécules naturelles extraites de plantes, de cellules de mammifères ou de microorganismes ont été reconnues comme activatrices des lymphocytes T V γ 9V δ 2. Ces composés ayant une structure chimique commune composée d'un radical alkyle et d'un pyrophosphate ont été nommés **phosphoantigènes** (Figure 10). A ce jour, le PAg naturel

qui a la plus grande réactivité connue est le (*E*)-Hydroxydiméthylallyl pyrophosphate (HDMAPP). Sa capacité d'activation des lymphocytes T V γ 9V δ 2 est 1000 fois supérieure à celle de l'isopentenyl pyrophosphate (IPP)⁹⁴.

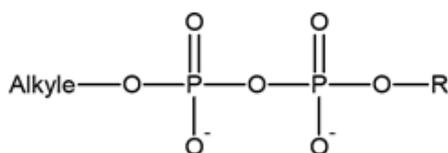


Figure 10 : Formule générale des PAgS. Extrait de ⁹.

Sur la base de cette structure chimique générale, un certain nombre de PAgS synthétiques ont été produits, avec des bioactivités très variables⁹⁵ (Table 2). Parmi ces PAgS, le bromohydrine pyrophosphate (BrHPP) ou PhosphotimTM est connu comme un très bon activateur des lymphocytes T V γ 9V δ 2 et est utilisé en expérimentation et dans les essais cliniques d'immunothérapies anticancéreuses à base de lymphocytes T V γ 9V δ 2^{94,96}.

Designation	Chemical name	Structure (as acid form)
BrHPP	3-(bromomethyl)-3-butanol-1-yl pyrophosphoric acid	
IPP	3-methyl-3-buten-1-yl pyrophosphoric acid	
C-HDMAPP	(2E)-1-Hydroxy-2-methyl-2-pentenyl-pyrophosphonic acid	

Table 2 : Exemples de phosphoantigènes. Extrait de ⁸.

II-3-1-2- Biosynthèse des phosphoantigènes

Les PAgS naturels les plus réactifs sont des intermédiaires de synthèse de la voie métabolique des isoprénoïdes. Il existe deux voies de synthèse de ces molécules : la voie du mévalonate dans les cellules eucaryotes non photosynthétiques et la voie du DOXP (1-désoxy-

D-xylulose-5-phosphate) ou voie de Rohmer chez les procaryotes et les cellules eucaryotes de plantes. Bien que les points de départ et les intermédiaires de synthèse soient différents pour ces deux voies, elles aboutissent toutes les deux à la synthèse de l'IPP et de l'HDMAPP⁹⁷.

Certains inhibiteurs pharmacologiques de la voie du mévalonate, connus à ce jour comme traitements de référence de pathologies métaboliques, influencent par leur activité la synthèse de l'IPP. Notamment les statines, comme la mévastatine, molécules inhibitrices de l'HMG-CoA réductase, conduisent à une inhibition de la synthèse d'IPP. En revanche, les aminobiphosphonates (ABP), comme le zolédronate, provoquent une inhibition de la farnésyl-PP synthase. Cette enzyme permet la combinaison de deux molécules d'IPP pour obtenir du géranyl-PP. Son inhibition conduit donc à une accumulation d'IPP intracellulaire³³ (Figure 11).

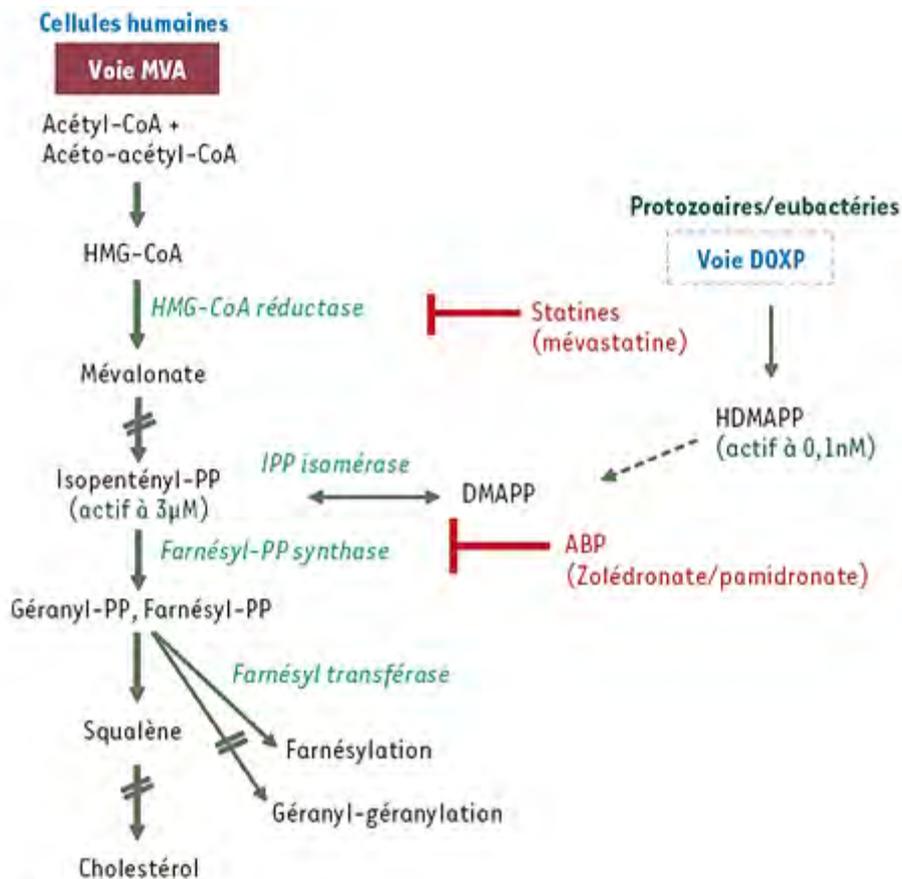


Figure 11 : Les voies naturelles de production des phosphoantigènes. Extrait de ³³. MVA : mévalonate.

L'utilisation de ces voies métaboliques chez de nombreuses espèces du vivant pourrait expliquer l'implication des lymphocytes T V γ 9V δ 2 dans la réponse immunitaire contre des

pathologies infectieuses variées. De plus, certains types de cellules cancéreuses surexpriment la voie du mévalonate. C'est une des raisons pour lesquelles les lymphocytes T V γ 9V δ 2 sont activés en présence de cibles cancéreuses⁹⁸.

II-3-1-3- Interaction TCR V γ 9V δ 2 et phosphoantigènes

Bien que de nombreuses études aient été réalisées dans ce domaine, les mécanismes d'activation des lymphocytes T V γ 9V δ 2 par les PAgS ne sont pas encore complètement élucidés. Pour être activés, les lymphocytes T conventionnels $\alpha\beta$ doivent reconnaître un Ag spécifique présenté par les molécules du CMH à la surface d'une CPA. Ce processus doit s'accompagner de signaux de costimulation. Partant de ce principe, de nombreuses molécules du CMH classiques et non classiques ont été testées comme molécules de présentation des PAgS. Il s'est avéré que les molécules du CMH de classe I et II, TAP (transporter associated with antigen processing) et CD1 ne sont pas nécessaires à l'activation des lymphocytes T V γ 9V δ 2^{62,99,100}. L'hypothèse selon laquelle les lymphocytes T V γ 9V δ 2 seraient capables de reconnaître des PAgS sans présentation ni restriction par les molécules du CMH a donc émergé. Elle est soutenue par certaines observations expérimentales. En effet, les lymphocytes T V γ 9V δ 2 exposés à des PAgS en absence de toute autre cellule accessoire sont activés, sécrètent du TNF- α et ont une activité cytotoxique^{99,101}.

D'autres molécules comme la F1-ATPase ont été proposées pour la présentation des PAgS. En effet, une étude montre que la F1-ATPase est exprimée à la surface des cellules tumorales lysées par les lymphocytes T V γ 9V δ 2. La F1-ATPase purifiée à partir de cellules cancéreuses induirait une activation sélective des lymphocytes T V γ 9V δ 2 en présence d'une forme délipidée de l'apolipoprotéine A1 (Apo A1)¹⁰². Cependant, aucune expérience de co-immunoprécipitation entre la F1-ATPase et le TCR V γ 9V δ 2 n'a pu être réalisée à ce jour et le rôle de la F1-ATPase en tant que molécule présentatrice des PAgS n'est pas formellement démontré.

Néanmoins, les recherches dans ce domaine ont connu des avancées substantielles ces dernières années. Lorsque Harly et ses collaborateurs ont montré que l'AcMo 20.1 dirigé contre la butyrophiline 3A (BTN3A/CD277) activait les lymphocytes T V γ 9V δ 2 *via* leur TCR, mimant ainsi l'action des PAgS¹⁰⁴, un engouement pour ces recherches s'est déclenché, aboutissant

aujourd'hui à la confrontation de deux théories quant au modèle de présentation des PAgS par la butyrophiline.

II-3-2- La butyrophiline 3A1

Les butyrophilines sont une famille de molécules apparentées à la superfamille des molécules de costimulation B7. Lorsqu'elles ont été décrites pour la 1^{ère} fois dans les années 1980, seule leur implication dans la lactation a été publiée. Puis, plus récemment, on leur a découvert une place importante dans l'immunomodulation des lymphocytes T. Cette famille comporte 13 membres dont BTN3A1, BTN3A2, BTN3A3, des BTN-like comme BTNL8 et SKINT-like (SKINTL). La plupart d'entre elles, conservées entre la souris et l'homme, possèdent deux domaines extracellulaires Ig-V et Ig-C et un domaine intracellulaire B30.2 important pour la transduction du signal¹⁰⁵.

Plusieurs membres de la famille des butyrophilines exercent des activités régulatrices sur les lymphocytes $T\gamma\delta$. Chez la souris, l'expression de SKINT1 dans les cellules épithéliales et stromales du thymus est importante pour la sélection positive des lymphocytes T $V\gamma 5V\delta 1$ et pour leur différenciation en cellules productrices d'IFN- γ durant la vie foetale^{106,107}.

Au cours d'une étude sur la caractérisation des BTN3A, Compte et ses collaborateurs ont généré des AcMo dirigés contre les molécules BTN3A/CD277¹⁰⁸. En testant la réactivité de ces Ac sur les lymphocytes T $V\gamma 9V\delta 2$, le groupe d'Emmanuel Scotet a découvert que le clone 20.1 active ces cellules spécifiquement *via* leur TCR, induisant leur sécrétion de cytokines et leurs fonctions cytotoxiques comme les PAgS, tandis que le clone 103.2 inhibe cette activation. De plus, le traitement par l'Ac 20.1 de lignées cancéreuses insensibles à l'activité cytotoxique des lymphocytes T $V\gamma 9V\delta 2$ augmente leur susceptibilité à être lysées. L'Ac 20.1 reconnaît les 3 isoformes de BTN3A/CD277. Ces chercheurs ont montré que seule l'isoforme BTN3A1 est responsable de l'activation des T $V\gamma 9V\delta 2$ et cela est dû à son domaine B30.2 intracellulaire. BTN3A3, qui possède aussi une partie intracellulaire mais avec un domaine B30.2 légèrement différent, n'induit pas l'activation des lymphocytes T $V\gamma 9V\delta 2$.¹⁰⁴ Ils ont alors proposé un modèle pour expliquer le mécanisme d'activation de ces lymphocytes, en présence ou non de l'Ac 20.1^{10,104} (Figure 12).

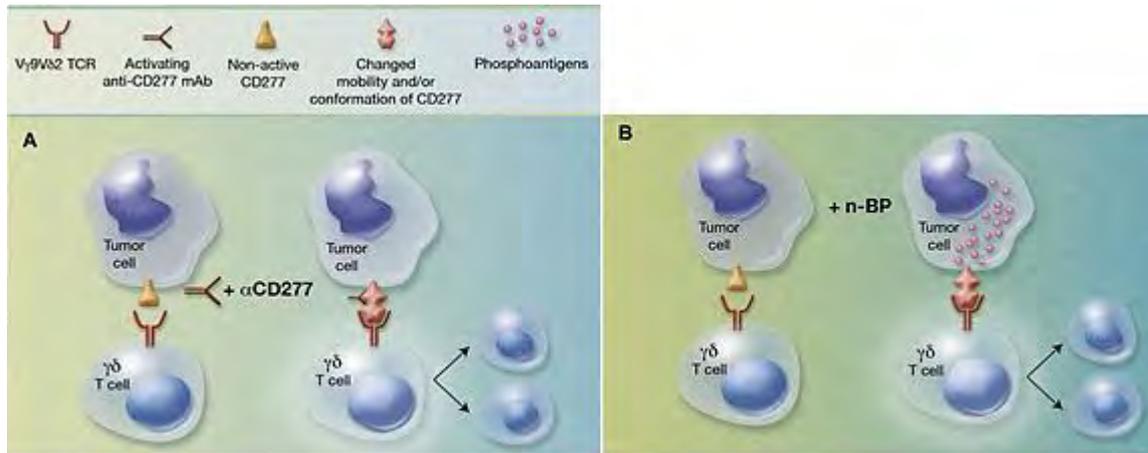


Figure 12 : Hypothèses sur le fonctionnement de la butyrophiline CD277 sur l'activation des lymphocytes T Vγ9Vδ2. Extrait de ¹⁰.

(A) La molécule ubiquitaire CD277 n'est pas reconnue par les lymphocytes T Vγ9Vδ2 (partie gauche). Suite à l'incubation avec l'AcMo anti-CD277, des modifications (mobilité et/ou conformation) seraient induites dans la molécule CD277 de telle sorte que les lymphocytes T Vγ9Vδ2 soient activés *via* leur TCR (partie droite). **(B)** Certaines cellules tumorales sont faiblement reconnues par les lymphocytes T Vγ9Vδ2 (partie gauche). Suite à un traitement avec des ABP (n-BP), une accumulation de PAg se produit dans la cellule tumorale ce qui entraînerait les modifications sur la molécule CD277 conduisant à l'activation des lymphocytes T Vγ9Vδ2 (partie droite).

Cette hypothèse a été alimentée par des études approfondies de la structure protéique des molécules BTN3A réalisées en cristallographie ^{6,109}. Ces études ont montré que les BTN3A se trouvent sous forme d'homodimères en forme de V à la membrane cellulaire, reliés par le domaine Ig-C à la membrane. Les Ac 20.1 et 103.2 se lient sur des épitopes différents sur le domaine Ig-V¹⁰⁹. Le domaine B30.2 possède une poche basique mais il n'y a pas de liaison de haute affinité avec les PAg⁶. A ce stade commence à émerger l'idée d'une ou plusieurs molécules adaptatrices nécessaires au processus de présentation.

Le groupe de Genaro DeLibero a proposé un autre modèle pour expliquer le mécanisme de présentation des PAg par BTN3A1. Utilisant une approche génétique, ils ont généré des transfectants exprimant uniquement le domaine Ig-V de BTN3A1 avec lesquels ils ont stimulé les lymphocytes T Vγ9Vδ2 : l'activation des Tγδ survient uniquement en présence de PAg. A l'aide d'une étude cristallographique, ils montrent que le domaine Ig-V possède une poche superficielle dans laquelle viendrait se fixer le PAg pour être directement présenté au TCR Vγ9Vδ2¹¹⁰. Ce modèle, qui semble résoudre toutes les interrogations concernant la présentation des PAg aux TCR Vγ9Vδ2, laisse tout de même quelques questions en suspens. Notamment, quel rôle est joué par le domaine B30.2, qui semble essentiel à l'activité activatrice de BTN3A1 sur les lymphocytes T Vγ9Vδ2 ? De plus, comment sont présentés les PAg intracellulaires

comme l'IPP ? L'IPP se lie-t-il à BTN3A1 sur le domaine B30.2 et entraîne-t-il le changement de conformation proposé dans le modèle décrit par Harly et *al.* ou est-il sécrété et directement recapturé à la membrane par BTN3A1 ?¹¹¹

L'étude la plus récente sur le sujet permet de répondre à quelques-unes de ces questions. Sandstrom et ses collaborateurs fournissent une meilleure caractérisation de la structure du domaine B30.2 de BTN3A1 et BTN3A3. Ils ont identifié une poche à la surface du domaine B30.2 de BTN3A1 chargée positivement où se logent les PAg. Pour confirmer leur découverte, ils ont induit une inversion de charge dans la poche de liaison en modifiant plusieurs acides aminés. Ces changements induisent une perte de réactivité des lymphocytes T V γ 9V δ 2. Ensuite, ils ont comparé les séquences protéiques des domaines B30.2 de BTN3A1 et BTN3A3. BTN3A1 possède une histidine en position 351 alors que l'on trouve une arginine sur BTN3A3. Ils ont alors généré des protéines recombinantes en inversant l'histidine et l'arginine en position 351 de BTN3A1 et BTN3A3. Dans ce cas, BTN3A1 ne peut plus lier les PAg alors que BTN3A3 devient réactif¹¹².

Ces expériences montrent clairement l'importance du domaine B30.2 de BTN3A1 pour son activité activatrice des lymphocytes T V γ 9V δ 2. Cela dit, toutes ces études s'accordent à dire qu'une ou plusieurs molécules adaptatrices sont nécessaires pour que le système fonctionne (Figure 13).

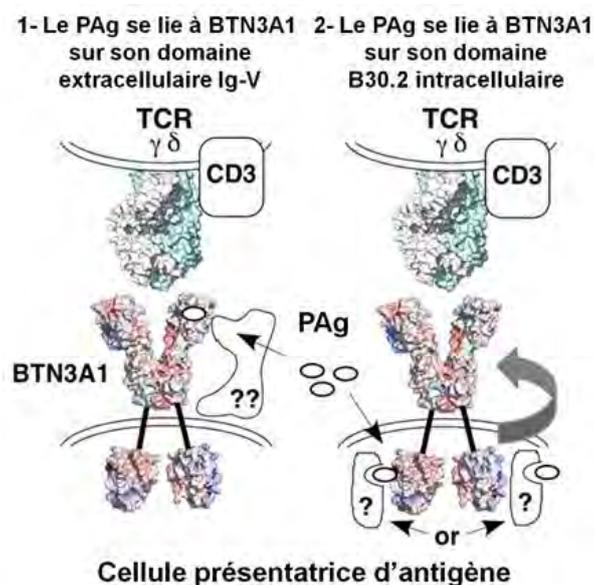


Figure 13 : Hypothèses proposées pour l'activation du TCR V γ 9V δ 2 par les PAg et BTN3A1. Modifiée à partir de ⁶.

Même si quelques zones d'ombre subsistent, la connaissance et la compréhension de l'activation des lymphocytes T V γ 9V δ 2 a fait un bond colossal avec la découverte du rôle de la butyrophiline BTN3A1.

II-3-3- Autres molécules modulatrices de l'activation des lymphocytes T V γ 9V δ 2

II-3-3-1- Les alkylamines et les aminobiphosphonates

Les alkylamines sont des composés chimiques pouvant être retrouvés en quantités millimolaires dans la nature, par exemple dans des extraits microbiens ou dans certaines plantes comestibles. Certains de ces composés, comme l'iso-butylamine, ont la capacité d'activer spécifiquement les lymphocytes T V γ 9V δ 2 en induisant leur prolifération et leur production d'IL-2¹¹³. Cependant, leur rôle dans l'immuno-régulation générale par les lymphocytes T V γ 9V δ 2 n'a jamais été démontré.

Les **ABP** sont des molécules connues depuis de nombreuses années comme des inhibiteurs de la résorption osseuse. Comme expliqué précédemment, ces molécules sont capables d'inhiber une enzyme intervenant dans la voie métabolique de biosynthèse du cholestérol, conduisant à une accumulation d'IPP intracellulaire³³. Au-delà de cette propriété, les ABP partagent une similitude structurale avec les PAgS (Figure 14).

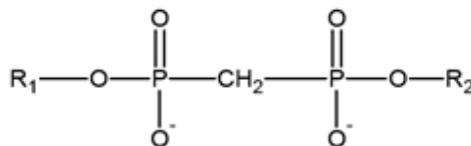


Figure 14 : Formule générale des ABP. Extrait de ⁹.

Une étude a montré que les ABP (zoledronate, alendronate, pamidronate) sont capables d'induire une prolifération significative des lymphocytes T V γ 9V δ 2 au sein des PBMCs de donneurs sains. Comme pour l'IPP, cette prolifération est strictement dépendante de l'IL-2. Les ABP induisent également une régulation positive de l'expression du CD25 (chaîne α du récepteur à l'IL-2) et du CD69 (marqueur d'activation apparaissant précocement à la surface des lymphocytes), montrant ainsi une activation effective des lymphocytes T V γ 9V δ 2. De plus, même en absence d'IL-2, les lymphocytes T V γ 9V δ 2 activés par les ABP produisent des cytokines pro-

inflammatoires (IFN- γ) et réalisent une cytolysse efficace en présence de cibles cancéreuses de type Daudi (lignée cellulaire de lymphome de Burkitt) et RPMI 8226 (lignée cellulaire de myélome multiple)¹¹⁴.

II-3-3-2- Les NKRs

Les lymphocytes T V γ 9V δ 2 expriment très fréquemment certains NKRs¹¹⁵. Notamment, le récepteur **NKG2D** est un récepteur de costimulation majeur pour les lymphocytes T V γ 9V δ 2. En effet, l'activation du complexe NKG2D/DAP10 conduit à une réponse amplifiée des lymphocytes T V γ 9V δ 2 après une activation du TCR par un PAg¹¹⁶. NKG2D est recruté au cours de la formation de la synapse immunologique établie entre les lymphocytes T V γ 9V δ 2 et leurs cellules cibles¹¹⁷. De plus, l'utilisation d'Ac bloquant NKG2D a permis de montrer que ce récepteur fournit un signal de costimulation important pour la cytotoxicité des lymphocytes T V γ 9V δ 2 dirigée contre des cellules cibles cancéreuses MICA/MICB⁺ et ULBPs⁺^{96,118}.

Les lymphocytes T V γ 9V δ 2 expriment également les hétérodimères activateurs **CD94/NKG2C** et inhibiteurs **CD94/NKG2A**¹¹⁹. Ils sont retrouvés exclusivement sur les cellules T_{EMRA} et leur expression est corrélée avec une diminution de l'expression du TCR V γ 9V δ 2¹²⁰. Le rôle régulateur du complexe CD94/NKG2A est connu depuis longtemps pour les lymphocytes T V γ 9V δ 2. Lors d'une activation par un PAg, tous les récepteurs CD94/NKG2A intracytoplasmiques vont être externalisés à la surface des lymphocytes T V γ 9V δ 2¹²¹. Puis, l'activation du complexe CD94/NKG2A conduit à une inhibition de la prolifération, une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires INF- γ et TNF- α , et une inhibition de la cytotoxicité dirigée contre des cellules cibles infectées ou cancéreuses¹¹⁹. En revanche, l'activité régulatrice du récepteur CD94/NKG2C sur les lymphocytes T V γ 9V δ 2 est connue depuis peu. Une étude menée chez des donneurs sains adultes a montré qu'environ 50% des lymphocytes T V γ 9V δ 2 expriment le récepteur NKG2C, mais seulement une minorité en possèdent un taux significatif (> 5%). Parmi les lymphocytes T V γ 9V δ 2 NKG2C⁺, certains expriment exclusivement NKG2C et d'autres sont doublement positifs pour NKG2C et NKG2A. Sur les cellules NKG2C⁺/NKG2A⁻, une stimulation du complexe CD94/NKG2C conduit à la prolifération des lymphocytes T V γ 9V δ 2, la production d'IFN- γ et de TNF- α et à une forte réponse cytolytique en présence de cellules cibles. Ceci montre que le récepteur NKG2C à la surface des lymphocytes T V γ 9V δ 2 est pleinement fonctionnel et

active les fonctions effectrices de ces lymphocytes. Par contre, sur les cellules $\text{NKG2C}^+/\text{NKG2A}^+$, une stimulation *via* NKG2C entraîne les mêmes effets que sur les cellules $\text{NKG2C}^+/\text{NKG2A}^-$, tandis qu'une activation *via* le CD94 inhibe la prolifération et les fonctions effectrices des cellules¹²⁰. L'ensemble de ces données montre que les NKR jouent un rôle important dans la régulation de l'activité des lymphocytes T $\text{V}\gamma 9\text{V}\delta 2$.

Les lymphocytes T $\text{V}\gamma 9\text{V}\delta 2$ expriment aussi la molécule **ILT2**, pour immunoglobulin-like transcript 2. Cette protéine interagit avec la molécule du CMH I non classique HLA-G. HLA-G a été détecté à la surface de cellules tumorales de mélanomes, de carcinomes rénaux, de tumeurs hématopoïétiques et de cancers ovariens. L'interaction HLA-G/ILT2 produit un signal inhibiteur pour la prolifération et la production d' $\text{IFN-}\gamma$ des lymphocytes T $\text{V}\gamma 9\text{V}\delta 2$ activés par un PAg¹²².

La figure 15 illustre les mécanismes de régulation de l'activation des lymphocytes T $\text{V}\gamma 9\text{V}\delta 2$ en fonction des signaux reçus par le TCR et les récepteurs NKR.

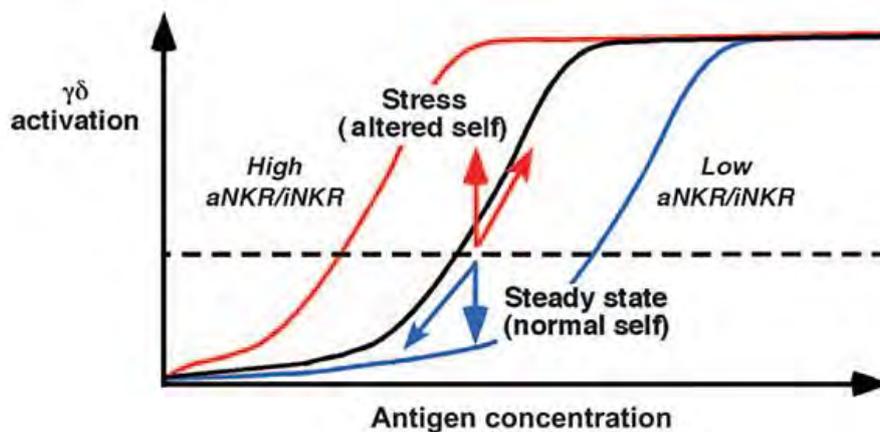


Figure 15 : Modulation de l'activation des lymphocytes $\text{T}\gamma\delta$ en fonction des signaux reçus par le TCR et les NKR. Extrait de ²⁹. aNKR : NKR activateurs, iNKR : NKR inhibiteurs.

La quantité d'antigène requise pour l'activation des fonctions prolifératives et effectrices des lymphocytes $\text{T}\gamma\delta$ (seuil d'activation représenté par la ligne pointillée) est contrôlée par les signaux activateurs et inhibiteurs délivrés par l'engagement des NKR exprimés par les lymphocytes $\text{T}\gamma\delta$. Elle est diminuée pour un ratio aNKR/iNKR élevé (courbe rouge) ou augmentée pour un ratio aNKR/iNKR faible (courbe bleue). A l'état basal, une faible expression du TCR $\gamma\delta$ et des aNKR et/ou une forte expression de molécules du CMH I non classiques engageant ILT2 ou CD94/NKG2A préviennent l'activation auto-immune des $\text{T}\gamma\delta$ (flèches bleues). Un stress (infection/transformation cellulaire) peut conduire à l'augmentation des antigènes du TCR $\gamma\delta$ et / ou à l'augmentation de l'expression des ligands des aNKR et à une diminution de l'expression des molécules du CMH I non classiques (flèches rouges), conduisant à l'activation des lymphocytes $\text{T}\gamma\delta$.

Dans la mesure où les lymphocytes T $\text{V}\gamma 9\text{V}\delta 2$ sont activés par des molécules endogènes sans restriction par les molécules du CMH, leur activation doit être finement contrôlée afin de

limiter les risques d'auto-immunité. La fréquente modification de l'expression des molécules du CMH I à la surface des cellules tumorales module les interactions entre les lymphocytes T V γ 9V δ 2 et leurs cellules cibles. Cela participe à la discrimination entre les cellules normales et les cellules transformées et renforce l'activation des lymphocytes T V γ 9V δ 2. D'autres mécanismes participent à la régulation de l'activation de ces, tels que les interactions entre les molécules d'adhésion, les signaux cytokiniques, les TLRs et les interactions *via* le CD16.

II-3-3-3- Les cytokines

En plus de l'activation par le TCR, l'activité des lymphocytes T V γ 9V δ 2 est fortement modulée par des signaux de costimulation fournis par leur environnement. Parmi ces facteurs, les cytokines de la famille de l'IL-2 (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 et IL-21) jouent un rôle important dans l'immunomodulation des lymphocytes T V γ 9V δ 2.

Les récepteurs de cette famille de cytokines sont des complexes protéiques qui ont en commun la chaîne γ_c et possèdent une ou deux chaînes supplémentaires spécifiques de la cytokine. Ensuite, la transduction du signal s'effectue par les voies de signalisation JAK/STAT³⁶ (Figure 16).

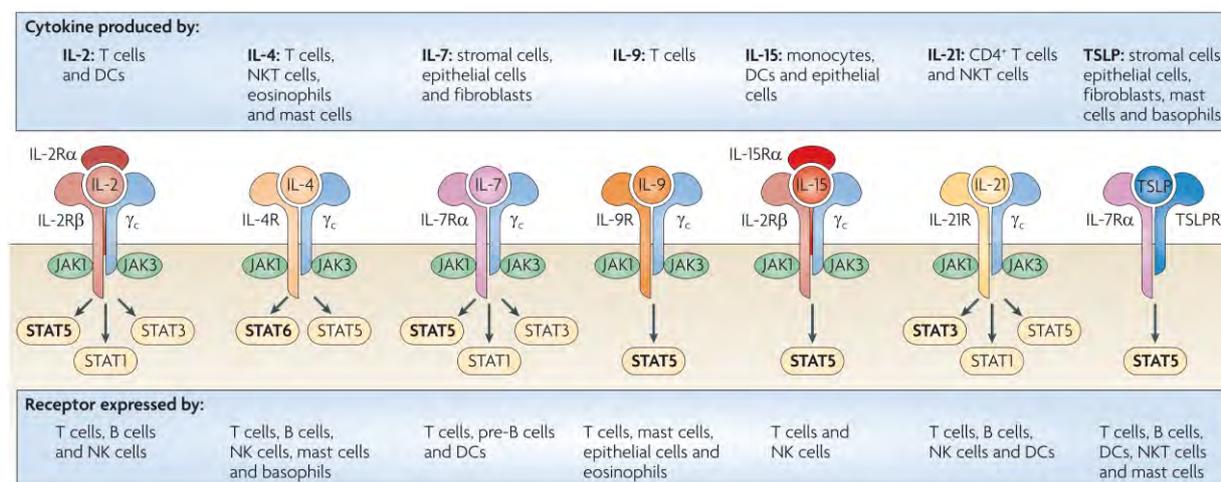


Figure 16 : Les cytokines de la famille de l'IL-2, leurs récepteurs et leurs voies de signalisation. Extrait de ³⁶.

L'IL-2 est la plus ancienne et la mieux étudiée dans cette famille. Elle agit comme un facteur de croissance des lymphocytes T, augmente la cytotoxicité des cellules NK et favorise la production des Ig par les lymphocytes B. Elle régule également la prolifération et l'apoptose des

cellules T activées³⁶. *In vitro*, en combinaison avec un PAg, l'IL-2 induit la prolifération et la maturation en cellules effectrices des lymphocytes T V γ 9V δ 2. *In vivo*, on observe une forte expansion des lymphocytes T V γ 9V δ 2 chez les primates traités par une combinaison de PAg et d'IL-2 non retrouvée chez les individus traités au PAg seul¹²³.

Les équipes des Dr. Fournié et Bonneville ont observé que l'IL-15 favorise également la prolifération des lymphocytes T V γ 9V δ 2 *in vitro* après une stimulation antigénique (données non publiées,²⁹). De plus, il a été montré que l'IL-15 joue un rôle important dans la différenciation des T_{CM} en T_{EM} ou T_{EMRA}³. D'autres cytokines de la famille de l'IL-2, comme l'IL-7 et l'IL-21, peuvent induire la prolifération des lymphocytes T V γ 9V δ 2 en combinaison avec un PAg, bien que leur efficacité soit moindre que celle de l'IL-2^{29, 124,125}. De plus, l'IL-21 seule n'a qu'un effet relativement faible quant à l'activation et l'induction des fonctions effectrices des lymphocytes T V γ 9V δ 2 activés par un PAg¹²⁵. En revanche, en combinaison avec l'IL-2, elle augmente la polarisation des cellules vers un phénotype effecteur cytolytique et favorise leurs fonctions anticancéreuses *via* une production plus forte d'IFN- γ et une augmentation de leur capacité de lyse des cellules tumorales¹²⁴.

II-3-3-4- Les Toll-Like Receptors

Les TLRs 3 reconnaissent les ARN double-brins associés au génome de certains virus¹²⁶. Ces TLRs peuvent également être activés par des ARN_m endogènes libérés par les cellules nécrotiques (par exemple au sein d'une tumeur solide)¹²⁷. L'équipe de Dieter Kabelitz a montré qu'une costimulation du TCR V δ 2 et des TLRs 3 entraîne une augmentation de la production d'IFN- γ par les lymphocytes T V γ 9V δ 2. De plus, ils ont observé une surexpression de certains gènes impliqués dans la cytotoxicité et dans la production de cytokines (TNF- α) et de chimiokines (MIP-1 α)¹²⁶. Il a également été montré qu'une costimulation TCR V δ 2/TLR 2 sur des lymphocytes T V γ 9V δ 2 augmente de la production de RANTES, d'IFN- γ et d'IL-8¹²⁸ et favorise la dégranulation des lymphocytes T V γ 9V δ 2¹²⁹.

II-3-3-5- Les récepteurs Fc

Les lymphocytes T V γ 9V δ 2 peuvent exprimer le Fc γ RIIIA ou CD16A, qui est un récepteur de basse affinité pour le fragment constant des Ig de type IgG. Ce récepteur, aussi exprimé par

les cellules NK, est impliqué dans les mécanismes d'ADCC. L'expression du CD16A par les lymphocytes T V γ 9V δ 2 est associée à la différenciation en effecteurs terminaux T_{EMRA}⁵. Ces cellules deviennent réfractaires au signal TCR mais peuvent être activées par la liaison du CD16A qui induit une production de TNF- α . Les expériences menées par Lafont et *al.* suggèrent que le CD16A exprimé par les lymphocytes T V γ 9V δ 2 aurait une meilleure affinité pour les IgG2a que pour les IgG1, contrairement à celui exprimé par les cellules NK (meilleure affinité pour les IgG1 et les IgG3). La formation du complexe IgG-CD16A entraîne l'activation des voies p38/MAPK et MEK/ERK, voies de signalisation impliquées dans la transduction du signal du TCR¹³⁰.

L'activation des lymphocytes T V γ 9V δ 2 est donc dépendante de nombreux signaux modulateurs. La connaissance des ligands activateurs et inhibiteurs de ces lymphocytes a permis d'envisager des stratégies thérapeutiques visant les lymphocytes T V γ 9V δ 2 dans le cadre de traitements de pathologies cancéreuses et infectieuses.

II-4- Propriétés antitumorales des lymphocytes T V γ 9V δ 2

Le potentiel cytolytique antitumoral des lymphocytes T V γ 9V δ 2 humains a été démontré à la fois *in vitro* sur des lignées cellulaires de cancers du sein¹³⁴, de lymphomes^{92,135} ou de carcinome du côlon¹¹⁸ et *in vivo* sur des souris immunodéficientes xéno greffées avec des cellules de lymphomes¹³⁶. Cette activité cytotoxique a aussi été montrée *ex vivo* sur des cellules issues de patients atteints de carcinomes rénaux^{96,137}, de cancers de la prostate¹³⁸ ou encore de myélomes multiples¹¹⁴.

La cytotoxicité des lymphocytes T V γ 9V δ 2 vis-à-vis de leurs cellules cibles s'exerce *via* différents mécanismes d'induction de mort cellulaire. D'une part, ils sécrètent des cytokines pro-inflammatoires IFN- γ et TNF- α et des granules lytiques. Ils expriment également des ligands des récepteurs de mort FasL et TRAIL. Ces facteurs vont cibler directement la cellule tumorale. D'autre part, les lymphocytes T V γ 9V δ 2 peuvent aussi avoir une activité cytotoxique *via* le mécanisme d'ADCC.

L'IFN- γ est fortement impliqué dans le contrôle du développement tumoral. Effectivement, des études réalisées chez des souris rendues insensibles à l'IFN- γ et exposées à un agent carcinogène ont montré que la fréquence et la rapidité de développement des tumeurs

sont plus importantes chez ces souris comparées aux souris sauvages¹³⁹. De plus, les souris dont les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont incapables de sécréter de l'IFN- γ ont une plus grande susceptibilité au développement de tumeurs que les souris sauvages. Cela montre que les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont une source majeure d'IFN- γ nécessaire à la réponse immunitaire antitumorale¹⁴⁰. L'IFN- γ possède plusieurs propriétés antitumorales. Il a une action antiproliférative^{141,142} et antiangiogénique¹⁴³. En outre, l'IFN- γ tient une place importante dans la mise en place des réponses adaptatives impliquant les lymphocytes T $\alpha\beta$ ^{140,144}.

Le TNF- α possède deux récepteurs, TNFR1 et TNFR2. Leur activation peut induire différentes voies de signalisation suivant le contexte cellulaire. Dans la majorité des cas, la liaison du TNF sur ses récepteurs va conduire à l'activation de gènes impliqués dans l'inflammation et la survie cellulaire, notamment *via* la voie IKK/NF- κ B. Mais lorsque l'activation de NF- κ B est inadéquate, les molécules TNF/TNFR1 activent la voie des caspases (caspases 8 et 3) entraînant l'apoptose de la cellule cible¹⁴⁵.

Les lymphocytes T V γ 9V δ 2 sécrètent également des granules lytiques contenant les granzymes A, B, M, la perforine et la granulysine¹⁴⁶⁻¹⁴⁸. L'expression de ces molécules par les T V γ 9V δ 2 est corrélée à leur stade de maturation. En effet, elle est maximale au stade T_{EMRA} tandis qu'elle est nulle aux stades T_N et T_{CM}^{2,5}. La perforine forme des pores dans la membrane de la cellule cible. Seule, elle peut donc induire la lyse de la cellule tumorale. Cependant, il semble que le mécanisme principal de mort induite par les granules lytiques soit l'apoptose liée à l'action combinée de la perforine et des granzymes. Les granzymes s'introduisent par les pores membranaires formés par la perforine et vont induire la mort de la cellule en activant les caspases ou *via* des voies caspase-indépendantes³⁴ (Figure 17).

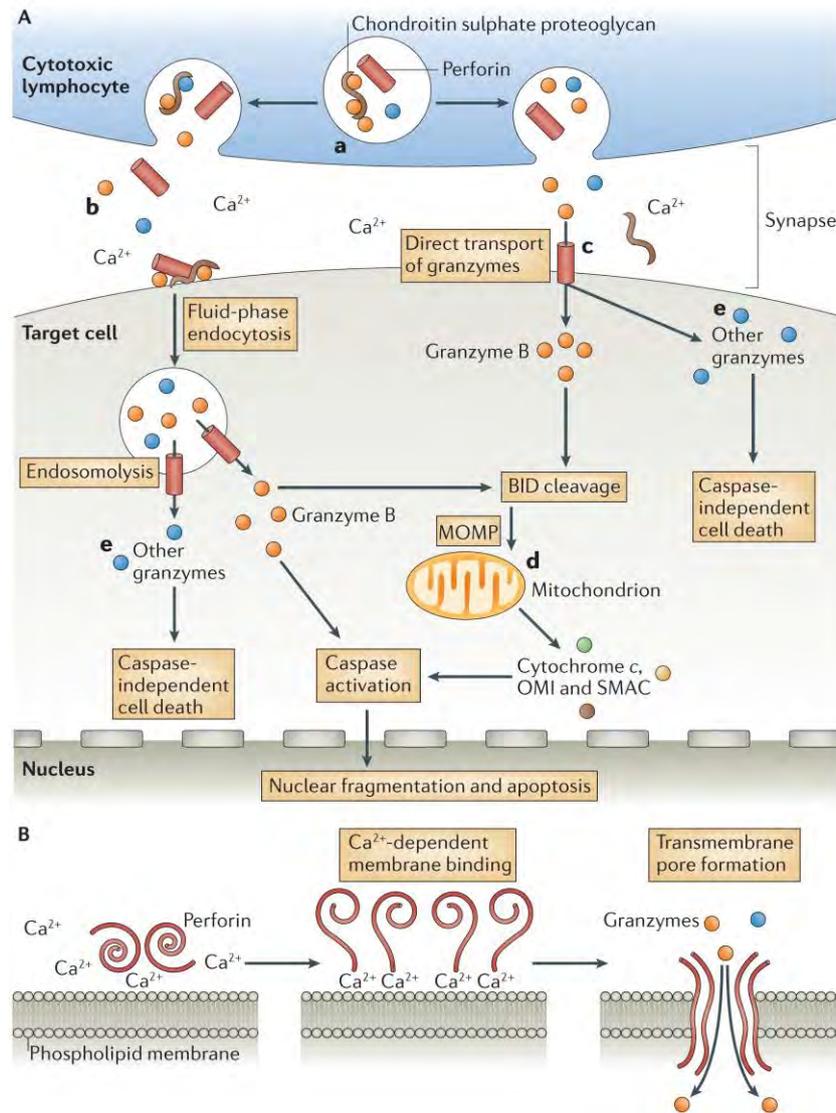


Figure 17 : Mécanismes de mort cellulaire induite par les granules lytiques. Extrait de ³⁴.

Les ligands des récepteurs de mort comme FasL et TRAIL sont retrouvés à la surface des cellules cancéreuses et induisent l'AICD (activated-induced cell death) des cellules cibles. FasL (CD95L) et TRAIL présents sur les T V γ 9V δ 2 se lient respectivement à Fas (CD95) et DR4/DR5 (Death Receptor 4/5) et vont engendrer la mort de la cellule tumorale par activation de la voie des caspases ou de la voie de la mort cellulaire mitochondriale¹⁴⁸⁻¹⁵⁰ (Figure 18).

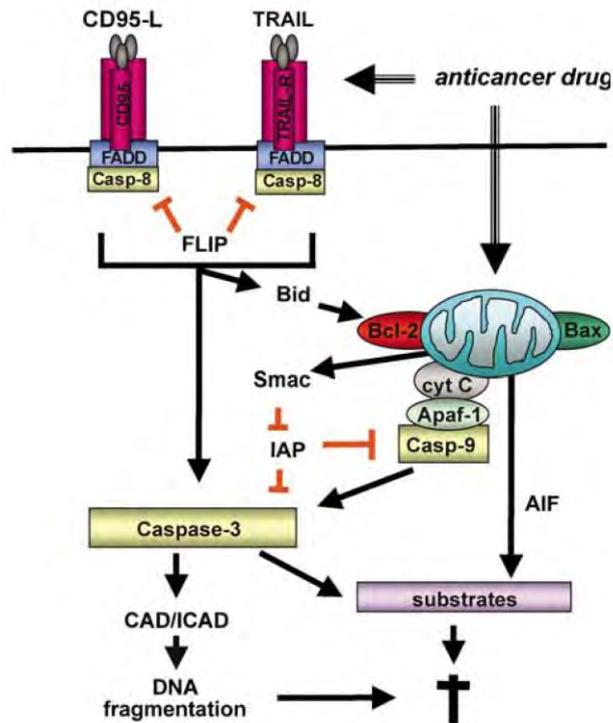


Figure 18 : Voies de signalisation des ligands et récepteurs de mort. Extrait de ¹.

L'ensemble de ces propriétés cytotoxiques, résumé dans la figure 19, fait des lymphocytes T V γ 9V δ 2 des cellules très importantes dans la réponse immunitaire antitumorale. C'est une des raisons pour lesquelles les lymphocytes T V γ 9V δ 2 représentent une cible intéressante pour les immunothérapies anticancéreuses.

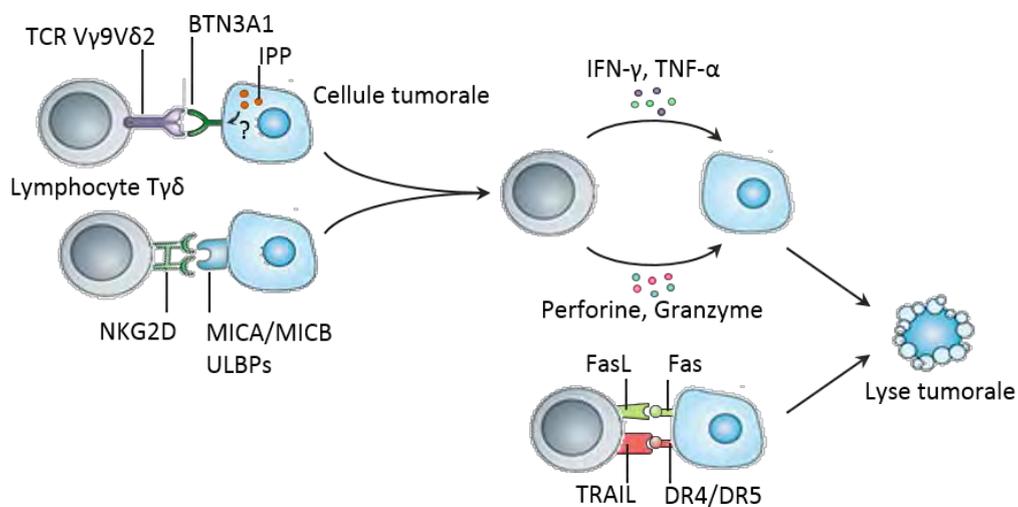


Figure 19 : Potentiel cytotoxique des lymphocytes T V γ 9V δ 2 vis-à-vis des cellules cancéreuses.

III- LE MICROENVIRONNEMENT TUMORAL

Pendant des années, les scientifiques ont concentré leurs recherches contre le cancer sur la cellule cancéreuse elle-même et les caractéristiques du développement tumoral : potentiel de réplication illimité, auto-suffisance en facteurs de croissance, échappement à l'apoptose, résistance aux signaux inhibiteurs de croissance, promotion de l'angiogenèse, invasion tissulaire et métastase¹⁵¹. Cependant, il est devenu évident que le microenvironnement tumoral occupe une place essentielle dans le développement, la progression et la dissémination des tumeurs, si bien que l'immuno-échappement tumoral émerge aujourd'hui comme une nouvelle caractéristique du cancer¹⁵². Parmi les éléments qui constituent ce microenvironnement, on retrouve des cellules mésenchymateuses, des éléments de la matrice extracellulaire, des vaisseaux sanguins et des cellules du système immunitaire ainsi que de très nombreux facteurs solubles (Figure 20). Nous verrons ici les principaux acteurs de ce microenvironnement, leur fonction au sein de la tumeur et les mécanismes de l'immuno-échappement tumoral.

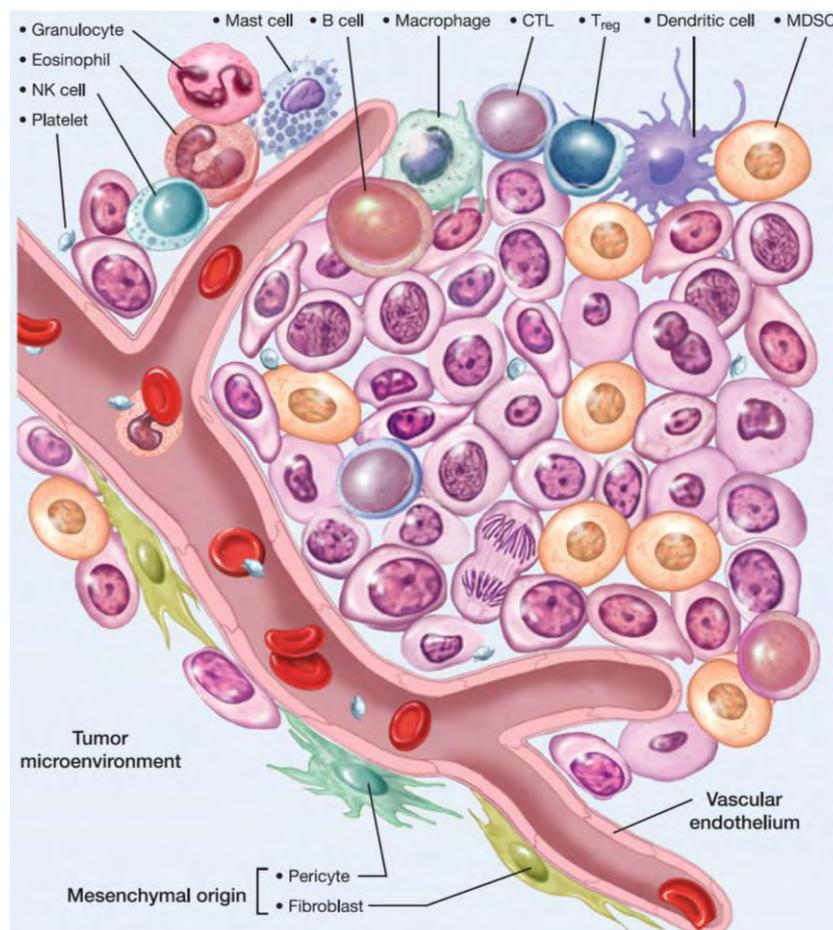


Figure 20 : Représentation schématique du microenvironnement tumoral. Extrait de ¹⁷.

III-1- Immuno-surveillance antitumorale

Les cellules de l'immunité innée constituent la première ligne de défense contre les pathogènes et les cellules tumorales. Elles interviennent rapidement et initient la réponse inflammatoire, puis vont sécréter des cytokines et des chimiokines qui vont permettre le recrutement des cellules de l'immunité adaptative. Les CPA, principalement les macrophages et surtout les DCs, vont interagir avec les lymphocytes T pour initier la réponse adaptative spécifique de l'agent pathogène ou de la tumeur.

III-1-1-1- Reconnaissance des cellules tumorales

Pour obtenir une réponse antitumorale efficace, il faut en premier lieu que les cellules de l'immunité innée distinguent les cellules tumorales des cellules saines et les identifient comme représentant un danger pour l'organisme. Plusieurs mécanismes sont impliqués dans cette reconnaissance (Figure 21)¹¹.

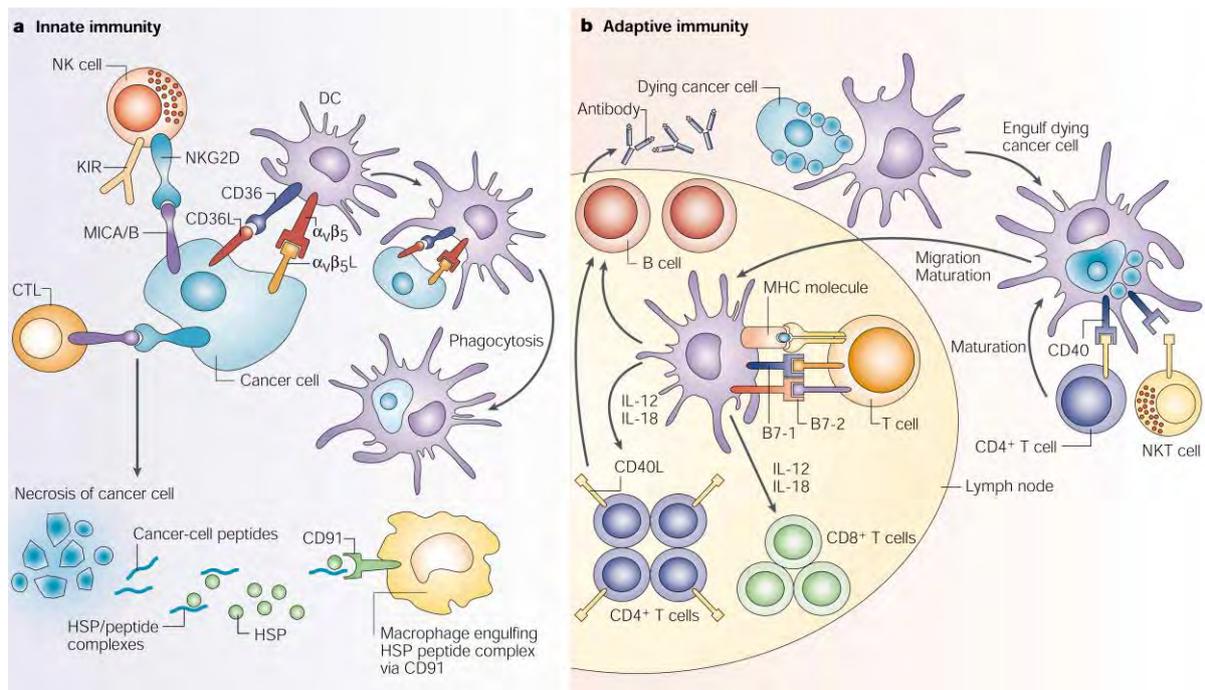


Figure 21 : Les mécanismes de reconnaissance des cellules tumorales par le système immunitaire. Extrait de ¹¹. CTL : lymphocytes T cytotoxiques.

Les DCs et les macrophages, par l'intermédiaire de leur PRR, vont identifier des molécules transformées sur les cellules cancéreuses. Elles peuvent alors les phagocytter en utilisant leur récepteur CD36 et les intégrines $\alpha_v\beta_5$. De plus, la nécrose des cellules tumorales libère des alarmines, telles que les HSP (Heat-Shock Proteins) et des peptides tumoraux qui pourront être endocytés par l'intermédiaire des récepteurs scavengers comme CD91 présents sur les CPA¹¹.

D'autres cellules immunitaires, comme les cellules NK et les lymphocytes $T\gamma\delta$, peuvent identifier directement les cellules cancéreuses, par l'intermédiaire des molécules de stress cellulaire comme MICA, MICB et les molécules ULBPs. De plus, les cellules NK et les lymphocytes $T\gamma\delta$ exprimant des récepteurs KIR peuvent détecter la diminution de l'expression du CMH de classe I sur les cellules cancéreuses, phénomène fréquent lors de la transformation des cellules saines en cellules tumorales. Dans le cas des lymphocytes $T\gamma\delta$, rappelons aussi que certaines cellules cancéreuses peuvent produire de grandes quantités d'IPP qui vont activer les lymphocytes T $V\gamma 9V\delta 2$ ^{64,97,153}.

De leur côté, les lymphocytes T CD4 et T CD8 et les cellules NKT ont besoin d'interagir avec une CPA qui va leur présenter les Ags tumoraux par les molécules du CMH. Au cours de cette interaction, la CPA va aussi fournir les signaux de costimulation nécessaires à leur activation, par l'intermédiaire des molécules CD80 et CD86 (B7-1 et B7-2), et CD40^{154,155}.

Les lymphocytes B sont activés lorsqu'ils rencontrent leur Ag spécifique, sans nécessité de présentation par les molécules du CMH. Certains Ags dits thymo-dépendants enclenchent un mécanisme qui requiert une interaction avec les lymphocytes Th2 pour que le lymphocyte B soit réellement activé. Le complexe Ag-BCR est internalisé puis l'Ag est digéré et est présenté à la surface du lymphocyte B aux lymphocytes Th2 par des molécules du CMH de classe II. Les lymphocytes B peuvent donc être des CPA. Cette interaction est renforcée par le complexe CD40-CD40L, et par la sécrétion d'IL-4 par les lymphocytes Th2⁷.

III-1-1-2- Dynamique de la réponse immunitaire antitumorale

L'ensemble des mécanismes présentés ici sont illustrés dans la figure 22.

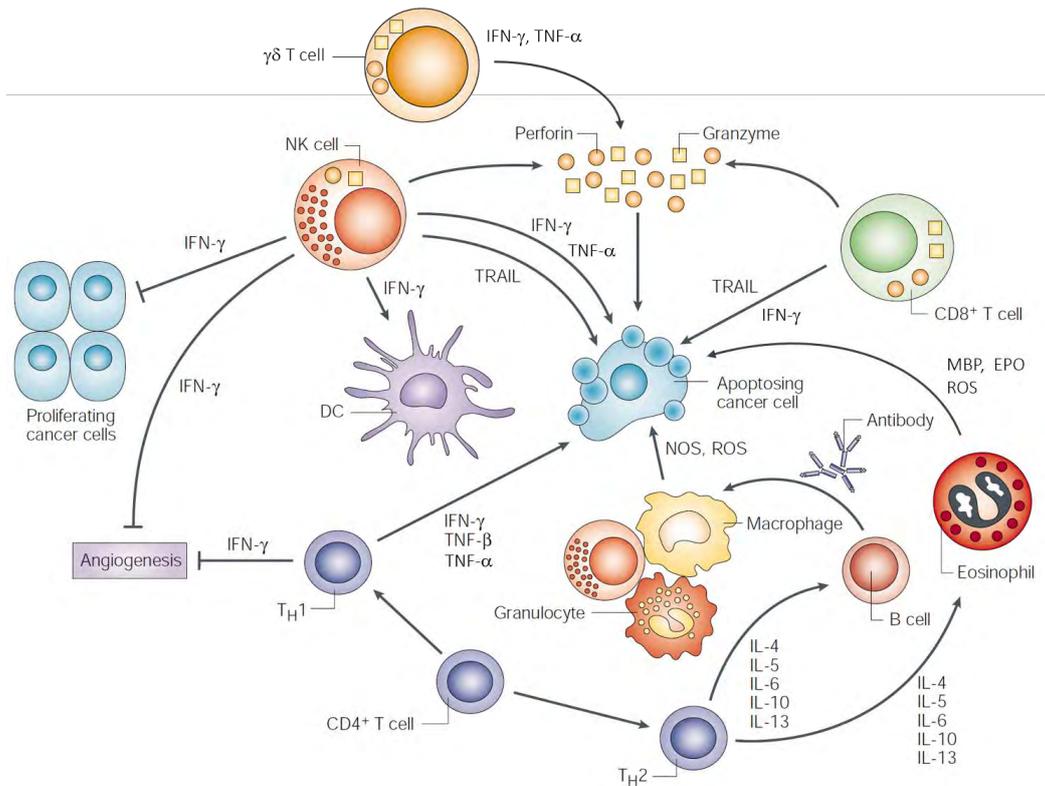


Figure 22 : Action coordonnée des cellules de l'immunité innée et adaptative dans la réponse immunitaire antitumorale. Modifiée à partir de ¹¹.

Dans un premier temps, les lymphocytes T $\gamma\delta$ et les cellules NK vont identifier les cellules tumorales et être activés à leur contact. Ils vont sécréter des cytokines pro-inflammatoires de type IFN- γ et TNF- α et les granules lytiques contenant de la perforine et des granzymes. La sécrétion de ces molécules, associée à l'engagement des récepteurs de mort par FasL et TRAIL, entraîne la mort des cellules cancéreuses^{156,157}.

Parallèlement, les DCs et les macrophages de type M1 vont phagocytter les cellules tumorales participant ainsi à l'élimination de la tumeur¹⁵⁸.

Dans le même temps, les granulocytes vont aussi intervenir dans la réponse inflammatoire. Il est reconnu que les éosinophiles et les neutrophiles produisent de nombreux facteurs pouvant être impliqués dans le développement et la progression tumorale ainsi que dans l'angiogenèse. Cependant, de plus en plus de preuves montrent qu'ils peuvent aussi intervenir dans la réponse antitumorale^{159,160}. Les neutrophiles expriment TRAIL et FasL et produisent des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui vont induire la mort directe des cellules tumorales. De plus, au contact des cellules tumorales, ils sécrètent de nombreuses cytokines et

chimiokines comme le TNF- α , IL-1 β , CXCL8, CXCL1 et CCL3, qui sont impliquées dans l'apoptose, le recrutement et l'activation des autres cellules du système immunitaire^{159,161}. Quant à eux, les éosinophiles sécrètent une très grande quantité de granules lytiques contenant de la MBP (Major Basic Protein) ou l'EPO (eosinophil peroxidase) cytotoxiques pour les cellules cancéreuses, ainsi que des ROS. Ils expriment le CMH II et les molécules de costimulation CD80, CD86 et CD40 et peuvent donc servir de CPA pour les lymphocytes T. Enfin, ils produisent aussi des cytokines et des chimiokines caractéristiques des réponses immunitaires Th1 comme l'IL-2, l'IL-12 et l'IFN- γ ¹⁶⁰.

Dans un second temps, les CPA, DCs et macrophages en tête, vont présenter les Ags tumoraux aux lymphocytes T afin d'initier la réponse immunitaire adaptative, en provoquant l'expansion clonale et l'activation des lymphocytes T CD4 et T CD8 spécifiquement réactifs aux Ags de la tumeur^{156,157,162}.

La fonction principale des lymphocytes T CD4 au cours de la réponse antitumorale est la sécrétion de cytokines : IL-2, IFN- γ et TNF- α pour les lymphocytes Th1 et IL-4, IL-5, IL-13 pour les lymphocytes Th2¹⁶³. Certaines cytokines, comme le TNF- α ou l'IFN- γ , ciblent directement les cellules cancéreuses^{142,145}. Les lymphocytes T CD4 interviennent également dans l'activation des cellules cytotoxiques et des lymphocytes B, grâce à l'expression de molécules de costimulation⁵⁷. L'interaction CD40-CD40L permet d'augmenter l'expression des molécules du CMH I et II sur les DCs, ce qui permet une meilleure activation des CTLs¹⁶⁴. Cette interaction est aussi impliquée dans la maturation des lymphocytes B en plasmocytes¹⁶⁵. De plus, l'IL-2 et l'IFN- γ sont des signaux de costimulation impliqués dans la différenciation et l'activation des cellules NK et des CTLs. De leur côté, les cytokines de type Th2 participent au recrutement et à l'activation des granulocytes et des lymphocytes B^{158,162}.

Les CTLs, activés par des CPA, expriment TRAIL, produisent des cytokines comme l'IFN- γ et des granules lytiques contenant de la perforine et du granzyme B. Ils ont donc un effet cytolytique direct sur les cellules tumorales^{158,166}.

Les lymphocytes NKT sont activés au contact des CPA qui leur présentent un Ag glycolipidique par la molécule CD1d et leur délivrent des signaux de costimulation *via* le CD40 et la sécrétion d'IL-12. Les lymphocytes NKT activés interviennent dans la réponse antitumorale *via*

deux mécanismes. D'une part, ils sécrètent de l'IFN- γ et de l'IL-4 et vont donc aider à l'activation des autres cellules du système immunitaire. D'autre part, certains lymphocytes NKT expriment les molécules TRAIL et FasL, et vont donc avoir une action cytotoxique directe sur les cellules tumorales²¹.

Lorsqu'ils sont activés après rencontre avec leur Ag spécifique, les lymphocytes B vont eux aussi subir une phase d'expansion clonale puis se différencier en lymphocytes B mémoires ou cellules productrices d'Ac, les plasmocytes. Les Ac produits par les plasmocytes et dirigés spécifiquement contre les cellules tumorales peuvent avoir un effet cytotoxique direct (selon la cible de l'Ac) et indirect. L'effet indirect est lié à l'activation des mécanismes d'opsonisation, de la cytotoxicité cellulaire dépendante du complément (CDC) et d'ADCC, impliquant notamment les cellules NK et les lymphocytes $T\gamma\delta$ ^{11,157}. Cependant, les preuves d'une réelle implication de la réponse humorale dans l'immuno-surveillance du cancer restent minces.

III-2- Immuno-édition tumorale et immuno-échappement

III-2-1- Théorie de l'immuno-édition des tumeurs

La théorie de l'immuno-surveillance n'explique pas comment la tumeur peut se développer en échappant au contrôle du système immunitaire et devenir cliniquement apparente. Le concept d'immuno-édition de la tumeur a été formulé par Robert Schreiber au début des années 2000 pour expliquer comment le système immunitaire façonne la tumeur au cours de son développement, en ayant tour à tour un rôle protecteur ou un rôle promoteur de tumeur^{144,167}. Selon cette théorie, les mécanismes responsables de ces altérations tumorales ont lieu tant au niveau de la cellule cancéreuse elle-même qu'au niveau des autres éléments du microenvironnement tumoral. Ils se déroulent en trois phases distinctes suivant la nature des événements qui se déroulent, le moment auquel ils surviennent, le type de cellules immunitaires impliquées et la nature des Ags spécifiques exprimés à la surface des cellules transformées. La première phase, l'élimination de la tumeur par le système immunitaire, correspond à l'immuno-surveillance. Puis arrive la phase d'équilibre où le développement de la tumeur va subir une phase de latence et où va se dérouler l'immuno-édition de la tumeur. Enfin, survient la phase

d'immuno-échappement tumoral où la tumeur va reprendre sa croissance et va devenir cliniquement apparente^{23,144} (Figure 23).

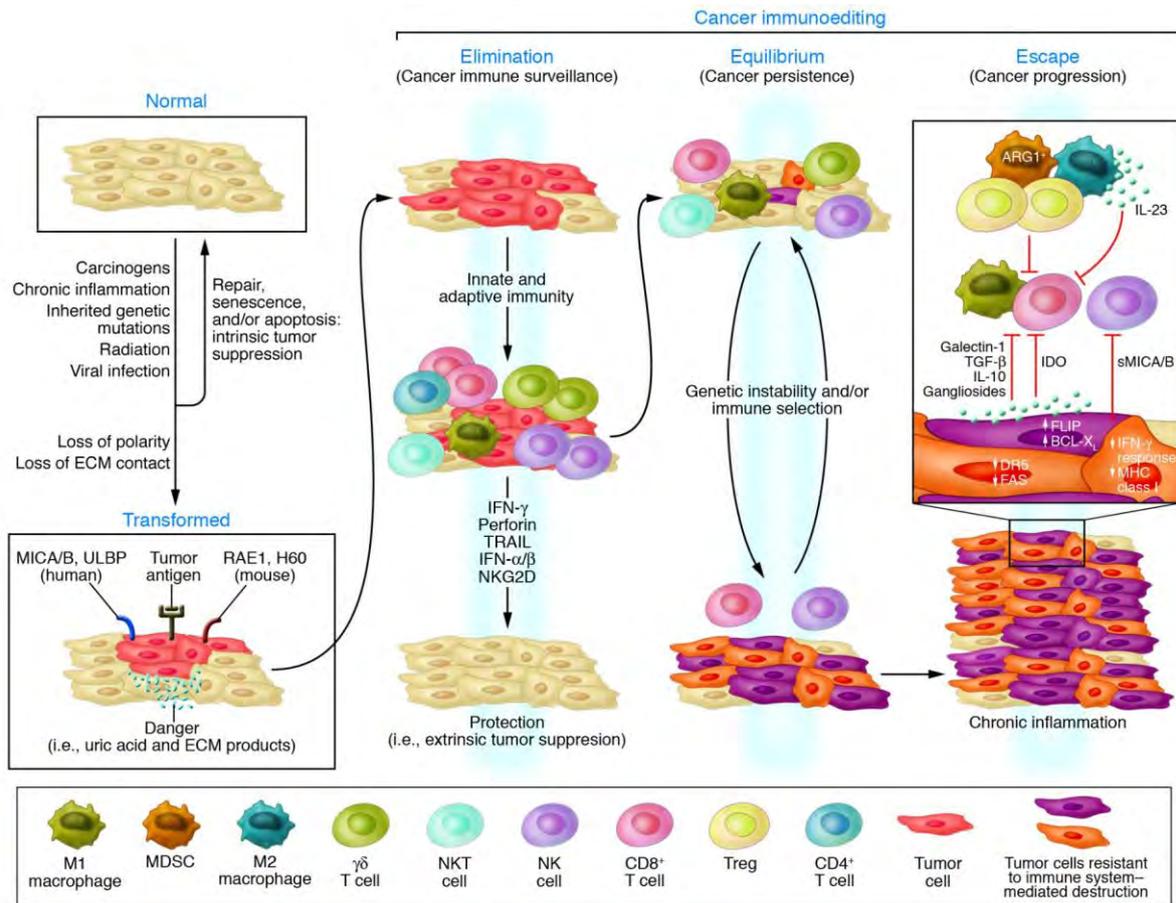


Figure 23 : Les trois phases de « l'immuno-édition » du cancer. Extrait de ¹³.

IDO : indoléamine 2,3-dioxygénase ; sMICA/B : soluble MICA/B ; ARG1 : arginase 1 ; FLIP : FLICE (FADD-like IL-1β-converting enzyme)-inhibitory protein.

III-2-2- Phase d'équilibre et immuno-édition des cellules cancéreuses

Durant la phase d'élimination, les cellules cancéreuses sensibles à l'action du système immunitaire sont détruites. Mais certains clones tumoraux résistants vont émerger progressivement.

La phase d'équilibre commence lorsque la tumeur entre « en dormance », une phase de latence durant laquelle elle ne va plus progresser car elle est gardée sous contrôle du système immunitaire. Durant cette période se déroulent les mécanismes d'immuno-édition. Sous la pression de sélection exercée par le système immunitaire sur les cellules tumorales, ces

dernières vont se transformer et acquérir des caractéristiques qui leur permettent de résister aux cellules immunitaires. Comment se déroule l'immuno-édition des cellules tumorales ? Plusieurs études ont apporté des réponses quant à ces mécanismes mais ils restent encore largement inconnus faute de modèles d'étude appropriés. Par exemple, une étude a été menée sur un patient atteint d'un mélanome exprimant les Ags NY-ESO-1, MAGE-C1 et Melan-A sur la tumeur primaire. Ce patient a été traité par un vaccin thérapeutique ciblant NY-ESO-1. Lors du suivi clinique du patient en rechute, les tumeurs néoformées se sont révélées négatives pour NY-ESO-1, alors qu'elles exprimaient MAGE-C1, Melan-A et CMH I. Cette étude montre que le processus d'immuno-édition des tumeurs peut aussi être une conséquence des immunothérapies anticancéreuses¹⁷³.

A l'équilibre, les lymphocytes T CD8, $T\gamma\delta$ et les cellules NK sont très présents dans le microenvironnement mais quelques cellules avec une action immunosuppressive comme les lymphocytes Tregs et les MDSCs vont aider au maintien des cellules tumorales¹⁷⁰. A ce stade, deux cytokines jouent un rôle très important dans le maintien de l'équilibre : l'IL-12 qui favorise l'élimination de la tumeur et l'IL-23 qui favorise la persistance tumorale. En revanche, l'IL-4, l'IL-17, le TNF et les IFN- α/β ne semblent pas impliqués¹⁷¹.

A l'issue de cette phase d'équilibre, de plus en plus de clones résistants vont se développer jusqu'à ce que le système immunitaire soit débordé et ne soit plus capable de contrôler l'expansion des cellules cancéreuses. La tumeur entre alors dans sa phase d'immuno-échappement, durant laquelle se met en place le microenvironnement immunosuppresseur.

III-2-3- L'immuno-échappement tumoral

L'échappement des cellules tumorales au système immunitaire résulte à la fois d'un ensemble de transformations se déroulant dans les cellules cancéreuses et d'une modification profonde du microenvironnement tumoral. Ces mécanismes sont résumés dans la figure 24.

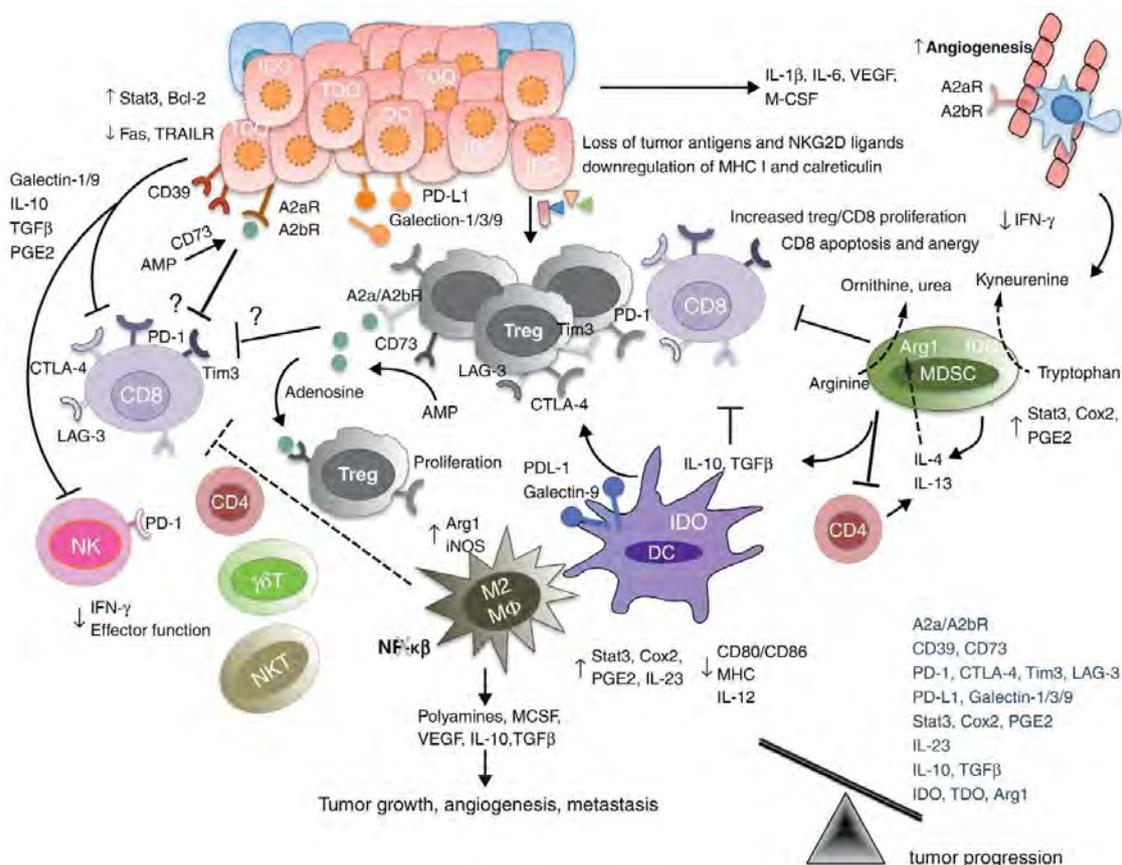


Figure 24 : Mécanismes responsables de l'immuno-échappement tumoral. Extrait de ²³.

III-2-3-1- Altérations survenant sur les cellules cancéreuses

La cellule tumorale déploie de nombreux moyens afin d'acquérir une résistance au système immunitaire. Nous avons déjà évoqué la modification de l'expression des Ags de tumeurs. Ceci peut s'accompagner d'une diminution de l'expression des molécules du CMH de classe I ou des molécules de costimulation qui empêche l'activation des cellules cytotoxiques²³. L'expression des molécules de stress MICA et MICB diminue également, rendant la tumeur invisible au système immunitaire^{174,175}.

Les cellules cancéreuses peuvent aussi se protéger *via* l'expression de formes mutées des récepteurs de mort DR5 et Fas^{176,177} ou au contraire, augmenter l'expression de molécules, comme FLIP (Flice-like Inhibitory Protein), responsable d'une résistance à l'apoptose induite par Fas¹⁷⁸ (Figure 18). Elles peuvent aussi augmenter l'expression de molécules pro-survie comme la molécule anti-apoptotique Bcl-2¹⁷⁹.

A leur surface, les cellules cancéreuses surexpriment les ectonucléotidases CD39 et CD73 qui vont convertir l'ATP extracellulaire, molécule de danger, en adénosine qui elle est immunosuppressive^{180,181}. Elles expriment aussi PD-L1 (Programmed cell death-ligand 1), qui agit sur son récepteur PD-1 (Programmed cell death-1) en inhibant l'activation et les fonctions des lymphocytes T¹⁸²⁻¹⁸⁴. D'autres molécules telles qu'IDO (indoléamine 2,3-dioxygnase)¹⁸⁵ et TDO (tryptophan 2,3-dioxygénase)¹⁸⁶, qui convertissent le tryptophane en kynurénines immunosuppressives, sont également impliquées dans l'immuno-échappement. Ceci crée une déplétion en tryptophane, élément essentiel pour la prolifération et la survie des lymphocytes T CD4. Les galectines 1, 3 et 9 sont également impliquées en diminuant l'activité et la survie des lymphocytes T et en stimulant l'angiogenèse¹⁸⁷. Enfin, les cellules tumorales sécrètent tout un panel de facteurs solubles comme du VEGF, du TGF- β , de l'IL-6 et de l'IL-10 qui sont inductrices d'angiogenèse¹⁸⁸. L'IL-6 participe au maintien de l'état inflammatoire au sein de la tumeur, ce qui favorise le recrutement de cellules immunosuppressives. Quant à lui, le TGF- β est essentiel dans le maintien de la tolérance périphérique par les lymphocytes Tregs. Il possède un effet immunosuppresseur sur les DCs, les macrophages, les cellules NK, les lymphocytes T $\alpha\beta$ et T $\gamma\delta$. Il agit tant sur la prolifération et la différenciation que sur les fonctions effectrices de ses cellules cibles. De même, l'IL-10 bloque l'activation et les fonctions des DCs et des macrophages, ainsi que des lymphocytes T CD4 et T $\gamma\delta$. L'IL-10 est aussi un facteur diminuant l'expression du CMH de classe I^{23,162,185}.

III-2-3-2- Modification du microenvironnement tumoral

Les cellules tumorales sont capables de recruter et de moduler les fonctions d'un ensemble de cellules stromales et immunitaires régulatrices qui vont inhiber les cellules effectrices antitumorales tout en favorisant l'angiogenèse et en maintenant un état inflammatoire propice au développement tumoral.

Parmi les cellules stromales immunosuppressives, on peut citer les **fibroblastes associés aux tumeurs** (CAFs) qui ont à la fois une fonction pro-angiogénique et immunosuppressive. Ils sécrètent du VEGF, la métallo-protéase MMP-9, du TGF- β et de l'IL-6¹⁸⁹.

Les **cellules souches mésenchymateuses** (MSCs) ont aussi un rôle important dans le microenvironnement de la tumeur. Elles ont une action immunosuppressive sur les lymphocytes

T $\alpha\beta$ et T $\gamma\delta$ et les cellules NK en inhibant leur activation, leur prolifération et leurs fonctions effectrices. Elles inhibent également la différenciation des DCs. Les MSCs agissent par contact et par la sécrétion de facteurs immunosuppresseurs tels que le TGF- β , l'IL-10, IDO et la PGE-2 (prostaglandine E2). Cette dernière agit sur les DCs en bloquant leur activation et leur maturation et sur les cellules NK et les lymphocytes T en bloquant leurs fonctions effectrices antitumorales¹⁸⁵.

Les **lymphocytes T régulateurs** (Tregs) sont nombreux dans le microenvironnement tumoral et sécrètent de grandes quantités de TGF- β et d'IL-10. Ils expriment aussi constitutivement la molécule CTLA-4 qui est impliquée dans leur activité immunosuppressive¹⁹⁰. CTLA-4 est exprimé sur tous les lymphocytes T activés et permet, en condition physiologique, de limiter leur suractivation. Pour cela, CTLA-4 se lie aux molécules de costimulation CD80/CD86 avec une plus forte affinité que CD28 et délivre un signal inhibiteur aux lymphocytes T¹⁶².

Les **Myeloid-Derived Suppressor Cells**, MDSCs, sont des cellules hétérogènes et immatures qui ont une activité suppressive sur les cellules immunitaires antitumorales. Elles expriment fortement deux enzymes qui ont pour substrat la L-arginine : iNOS et l'arginase 1. iNOS génère de l'oxyde nitrique qui inhibe les voies JAK/STAT dans les lymphocytes T et induit leur apoptose. L'arginase 1 surexprimée crée une déplétion de la L-arginine dans l'environnement des lymphocytes T, ce qui bloque leur prolifération. De plus, les MDSCs sécrètent des ROS qui altèrent les molécules de surface de lymphocytes T. Ces mécanismes sont, pour la plupart, contact-dépendants. Elles ont aussi un effet inducteur sur les lymphocytes Tregs *via* la sécrétion de TGF- β ¹⁹¹.

Nous avons vu que plusieurs facteurs du microenvironnement inhibent la maturation des DCs, ce qui se traduit par un défaut de présentation des Ags aux lymphocytes T et une diminution de l'expression de molécules de costimulation. Ces **DCs immatures** sont elles-mêmes immunosuppressives puisqu'elles induisent l'anergie des lymphocytes T et la tolérance tumorale¹⁸⁵.

Pour finir, les **macrophages associés aux tumeurs** ou TAMs sont eux aussi des composants essentiels dans le microenvironnement des tumeurs. Ce sont des macrophages de type M2 qui sécrètent de l'IL-10 et du TGF- β et aussi des chimiokines anti-inflammatoires. Ils

sécrètent aussi de nombreux facteurs de croissance comme le VEGF et le FGF (fibroblast growth factor) et des métalloprotéases MMP-2 et MMP-9, inductrices de l'angiogenèse¹⁵⁶.

Le microenvironnement tumoral est un milieu très hétérogène qui possède une évolution dynamique au cours du temps. Dans la phase d'immuno-échappement, de nombreux facteurs immunosuppresseurs vont inhiber la réponse antitumorale, y compris l'action des lymphocytes $T\gamma\delta$. D'autres facteurs sont présents dans ce microenvironnement et n'ont pas encore été évoqués ici, les alarmines. Ces molécules, définies comme des signaux de danger, peuvent avoir une influence considérable sur le système immunitaire. C'est le cas notamment de l'interleukine-33, ou IL-33, que nous allons développer dans le chapitre suivant.

IV- L'INTERLEUKINE 33

L'interleukine-33, ou IL-33, est une cytokine atypique du fait de sa dualité de fonctions à la fois intracellulaires et extracellulaires. Elle a tout d'abord été découverte par le groupe de Jean-Philippe Girard comme un facteur nucléaire préférentiellement exprimé dans les High Endothelial Venules (HEV) et nommée en conséquence NF-HEV²⁵⁹. Elle a été redécouverte par la suite comme étant le ligand du récepteur orphelin de la famille de l'IL-1 ST2 (IL-1R4) et renommée IL-33²⁶⁰. Elle appartient donc aux cytokines de la famille de l'IL-1. Elle a la propriété de fonctionner comme une alarmine¹² (Figure 25) et pourrait par conséquent jouer un rôle dans le processus de mort immunogénique, comme la protéine HMGB1 (High Mobility Group Box 1). L'IL-33 est d'ailleurs naturellement présente dans le microenvironnement tumoral, exprimée par les cellules endothéliales des vaisseaux classiques et des HEV^{259,261,262}. Les cytokines de la famille de l'IL-1, et notamment l'IL-33, activent des voies de signalisation très proches de celles des TLRs et ont une forte influence dans la différenciation et l'activation des cellules du système immunitaire²⁶³. Actuellement, l'IL-33 est connue essentiellement pour son rôle inducteur de réponse immunitaire de type Th2, mais de plus en plus d'évidences montrent qu'elle peut également induire des réponses cellulaires de type Th1²⁶⁴.

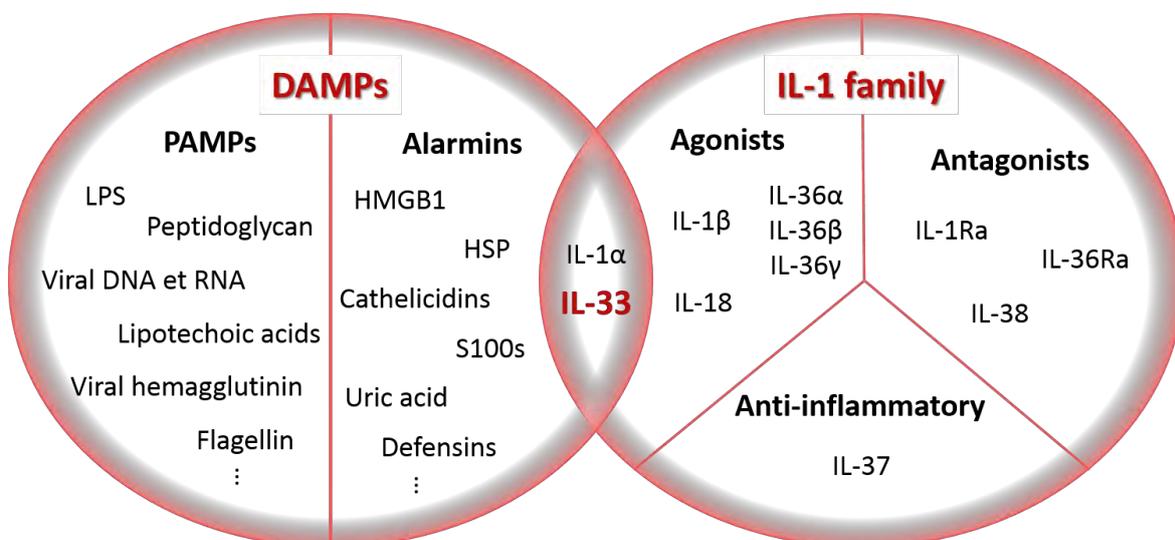


Figure 25 : L'IL-33 est un agoniste de la famille de cytokines de l'IL-1 qui possède les propriétés d'une alarmine.

IV-1- L'IL-33 : alarmine et cytokine de la famille de l'IL-1

IV-1-1- L'IL-33 est une alarmine

IV-1-1-1- La mort cellulaire immunogénique

Au début des années 1990, la théorie prédominante concernant le fonctionnement du système immunitaire se basait sur le principe de la distinction entre le soi et le non-soi infectieux, selon le modèle de Charles Janeway²⁶⁵. Ce postulat propose que cette discrimination entre le soi et les agents infectieux soit réalisée par les CPA *via* la reconnaissance des PAMPs par les TLRs. Cependant, cette théorie ne peut expliquer la mise en place de la réponse antitumorale, les réactions de rejet de greffe ou toute réaction inflammatoire stérile par extension. En 1994, pour pallier ces lacunes, Polly Matzinger propose une nouvelle hypothèse selon laquelle le système immunitaire ne se base pas sur la distinction du soi/non-soi infectieux mais sur l'identification de signaux de danger émis par des cellules endommagées lorsqu'elles sont exposées à des agents pathogènes, des toxines ou des traumatismes mécaniques²⁶⁶. Ces signaux d'alarme, les DAMPs, peuvent être exprimés de manière constitutive ou inductible. Ils peuvent être intracellulaires ou sécrétés ou encore être des constituants de la matrice extracellulaire. Ils ne seraient pas accessibles au cours d'un processus d'apoptose où la cellule est endocytée avant de se désintégrer mais seraient libérés avec le contenu cellulaire lors de la mort nécrotique²⁶⁷. Nous savons aujourd'hui que ces deux théories sont incomplètes en tant que telles et que le fonctionnement du système immunitaire implique une combinaison de ces deux hypothèses. Néanmoins, la théorie du danger pose les bases du concept de la mort immunogénique, qui prévoit que le type de mort cellulaire détermine la réponse immunitaire qui en découle²⁶⁷.

Quels sont donc les éléments requis pour que la mort cellulaire soit immunogénique ? Aujourd'hui, le paradigme concernant la mort immunogénique énonce que l'apoptose, processus de mort cellulaire physiologique, induit une séquestration des DAMPs et subséquemment une tolérance du système immunitaire tandis que la nécrose, non physiologique, permet la libération des DAMPs responsables de l'immunogénicité de la mort²⁶⁸.

Cependant, cette dichotomie n'est pas absolue puisque dans certains cas, l'apoptose peut entraîner une réponse immunitaire. En effet, Casares et ses collaborateurs ont été les

premiers à mettre en évidence une possible immunogénicité de la mort apoptotique, survenant lors de traitements par chimiothérapie. Ils ont montré que seules certaines chimiothérapies comme les anthracyclines, et notamment la doxorubicine, peuvent induire une réponse antitumorale spécifique et durable dans le temps avec un réel effet de vaccination thérapeutique²⁶⁹. Depuis, le groupe de Laurence Zitvogel en particulier s'est attaché à étudier les signaux émis par les cellules cancéreuses mourantes après traitement par chimiothérapie induisant une activation du système immunitaire²⁶⁸. L'émission de ces signaux est définie dans le temps et dans l'espace de manière précise (Figure 26)³⁹.

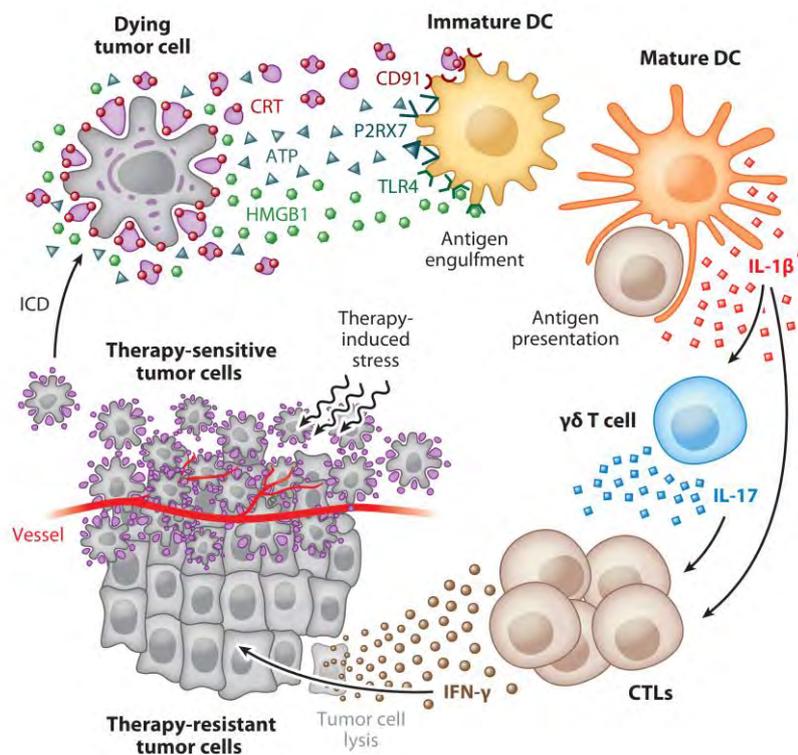


Figure 26 : Cascade évènementielle de la mort cellulaire immunogénique. Extrait de ¹⁵.

Peu de thérapies anticancéreuses connues à ce jour induisent cette cascade évènementielle de la mort immunogénique. Elles incluent certaines radiothérapies, le cyclophosphamide (agent alkylant de l'ADN), les anthracyclines dont la doxorubicine, l'oxaliplatine et le mitoxantrone²⁷⁰.

Les DAMPs ayant pour fonction d'alermer le système immunitaire en cas de danger, le terme alarmine a été proposé pour désigner ces molécules. Donc, on peut dire que les DAMPs

regroupent tous les signaux de danger, classés en deux catégories selon leur origine : les molécules d'origine exogène infectieuse sont des PAMPs, et celles d'origine endogène sont des alarmines²⁷¹.

IV-1-1-2- Définition des alarmines

Le terme alarmine a été proposé en 2006 par Joost Oppenheim pour désigner les molécules endogènes qui signalent des dommages tissulaires ou cellulaires. Pour être qualifiée d'alarmine, une molécule doit répondre à des critères précis²⁷¹ :

- Elle doit être rapidement libérée lors d'une mort cellulaire non programmée mais pas par les cellules apoptotiques dans lesquelles elle reste séquestrée ;
- L'expression et la sécrétion de cette molécule doivent aussi pouvoir être induites dans les cellules du système immunitaire sans qu'elles meurent, généralement en utilisant des voies de sécrétion non classiques ou *via* la voie de sécrétion réticulum endoplasmique/appareil de Golgi ;
- La molécule recrute et active les cellules de l'immunité innée qui expriment son récepteur, y compris les DCs, et donc de manière directe ou indirecte elle doit favoriser l'immunité adaptative ;
- Elle doit aider à restaurer l'homéostasie en favorisant la cicatrisation des tissus qui ont été endommagés soit par l'agression initiale, soit par l'inflammation qui en a résulté.

La table 3 présente une liste non exhaustive des alarmines et leurs impacts physiologiques et pathologiques. De toutes les alarmines connues, la molécule HMGB1 est celle qui regroupe le plus grand nombre de ces critères et représente le prototype de cette famille de molécules²⁷¹⁻²⁷³.

Alarmin	Origin	Intracellular physiological role	Extracellular actions	Release pathways	Receptors	Implicated diseases	Regenerative potential
HMGB1	All cell types including immune cells (non-histone nuclear protein)	Regulation of DNA transcription	Proinflammatory response (when bound to other DAMPs, e.g., LPS, IL-1 β , DNA, RNA) (S1); chemotaxis, proliferation, and differentiation of immune and precursor cells, including neurites and myocardial precursors; angiogenesis; induction of adaptive immune response	(a) Passive release by necrotic cells; (b) During apoptosis, HMGB1 is oxidized on Cys106, rendering it tolerogenic rather than proinflammatory (S2); (c) Active secretion via alternative pathway (not via Golgi route): HMGB1 undergoes several forms of post-translational modifications, e.g., acetylation, phosphorylation, methylation	TLR2, TLR4, RAGE (subject to redox states; S3, S4)	Acute trauma and related conditions (S5–S9); sepsis (S5, S10–S13); ischemic brain injury (S14–S16); ischemia/reperfusion injury of the heart (S16, S17); organ transplantation (S18–S20) Chronic conditions: arthritis (S21–S23), SLE (S24), MS (S25), T1DM (S26), epilepsy (S27)	Cardiac regeneration (S31–S34), revascularization (S35), skin wound healing (S36), bone repair (S37, S38), skeletal muscle (S39), nerve regeneration (S40)
S100A8/S100A9, S100A12 (humans only, absent in mouse)	Epithelial cells and phagocytes (40% of soluble cytosolic content in neutrophils)	Calcium regulation, cell motility	Pro-inflammatory response; neutrophil adhesion, migration, release from bone marrow; cytokine release by target cells, e.g., monocytes, endothelial cells; antibacterial and anti-parasite activity	(a) Active secretion by epithelial cells and innate immune cells via alternative pathway (i.e., bypass classical Golgi route); (b) Passive release by necrotic or damaged cells	S100A8/A9: TLR4, Carboxylated N-glycans/RAGE; S100A12: RAGE	Cancer (S28–S30) Acute: sepsis (S41, S42), acute lung injury (S43, S44), asthma (S45) Chronic: arthritis (S46–S54), gout (S55), vascular inflammation (S56), giant cell arteritis (S57), atherosclerosis (S58), lung diseases (S59), inflammatory muscle diseases (S60), skin wound healing (S61, S62)	Skin wound healing (S67–S69); liver regeneration (S70); musculoskeletal regeneration (S38, S47)
S100B (S71)	Astrocytes, oligodendrocytes, Schwann cells (cytosol)	Regulation of cell proliferation, differentiation, calcium homeostasis, transcription, motility, enzyme activity, transcription	Pro-proliferation, pro-differentiation	(a) Active release by astrocytes via activation of mGluR3; (b) Active release by Schwann cells via RAGE activation; (c) Passive release by damaged cells, e.g., in acute brain damage, melanoma	RAGE	Cancer (S63–S66) Neuronal death (S40, S72), biomarker for traumatic and ischemic brain damage (S73, S74), neurodegeneration (S75), schizophrenia (S76)	Nerve regeneration (S40, S77)
HSP60 and HSP70	All cell types (HSP60: mitochondria, HSP70: cytosol and nucleus)	Molecular chaperones in folding and assembly of multimeric protein structures and nascent polypeptide chains, respectively	Autoantigens stimulating immunoregulatory pathways to suppress inflammation; can also bind other ligands, e.g., LPS, to regulate proinflammatory cytokine release (S78)	Passive release by necrotic cells	TLR2, TLR4, SRA1	Sepsis (S78)	Immunization with HSPs induces Tregs in autoimmunity (e.g., RA, T1DM) and tissue and tumor transplantation, suppressing disease and transplant rejection (S79)
β -Defensins	Keratocytes and epithelial cells	N/A	Direct antimicrobial activity, enhance adaptive immunity	Active release	GPCRs, e.g., CCR6	Respiratory: cystic fibrosis, ARDS, infections Gastrointestinal: IBD	Direct antimicrobial activity by formation of pores in microbial cell
Cathelicidin hCAP18/LL-37	As above + neutrophils, mast cells, monocytes/macrophages	N/A	Direct antimicrobial activity, enhance adaptive immunity	Active release or degranulation	FPRL1	Respiratory: cystic fibrosis, ARDS, infections Gastrointestinal: IBD	Direct antimicrobial activity by formation of pores in microbial cell

Table 3 : Les alarmines, leurs fonctions physiologiques et leurs rôles en physiopathologie. Extrait de ³⁰.

Comme HMGB1, l'IL-33 rassemble toutes les caractéristiques nécessaires pour être qualifiée d'alarmine (Figure 27) :

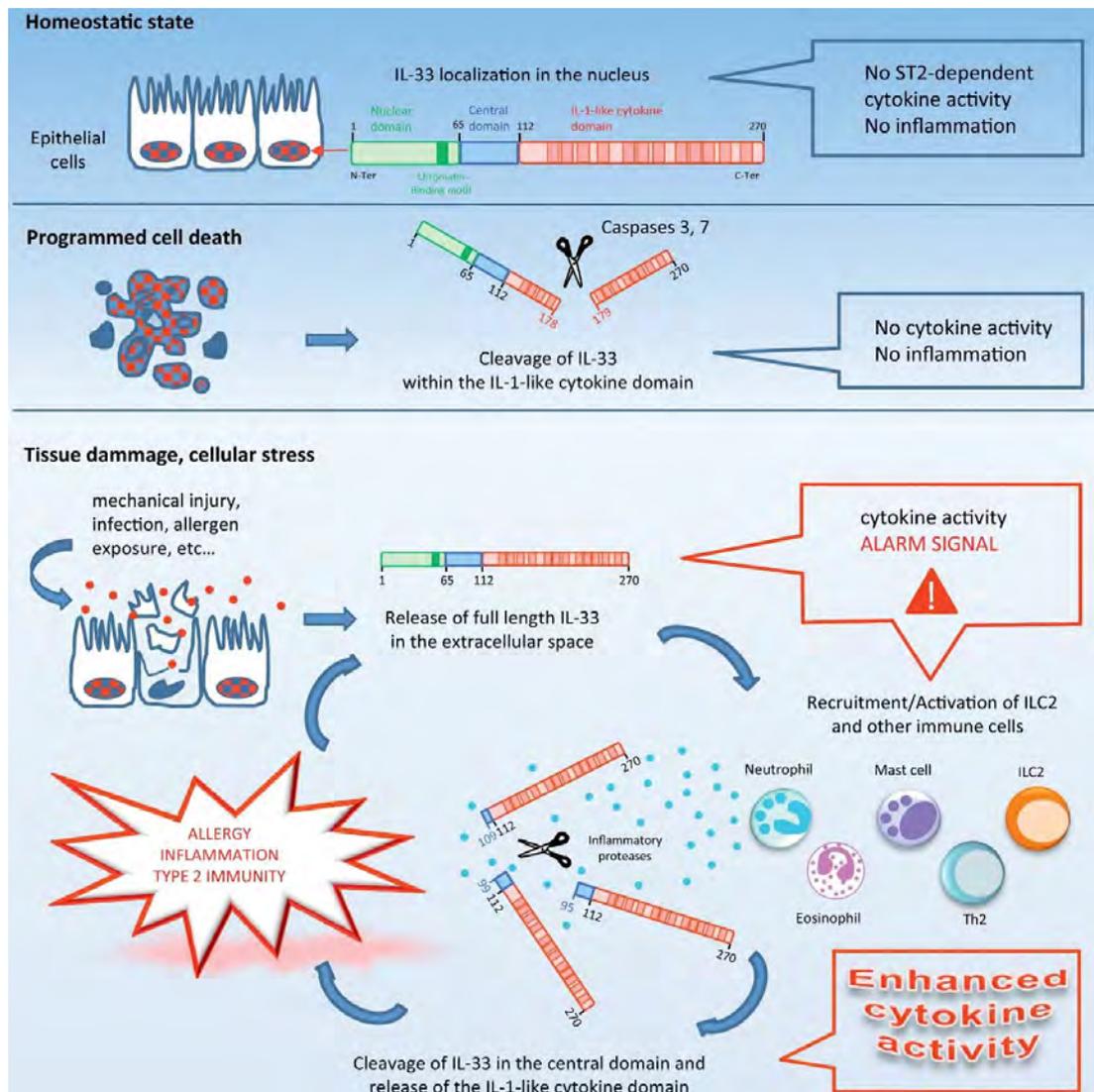


Figure 27 : L'IL-33 possède les caractéristiques d'une alarmine. Extrait de ¹².

- Stockée sous forme active dans le noyau des cellules, elle est rapidement libérée lors de la mort par nécrose, mais est inactivée par la caspase 1 et séquestrée dans les cellules lors de l'apoptose²⁷⁴ ;
- Elle est constitutivement exprimée dans les monocytes humains du sang circulant²⁷⁵ et son expression peut être induite dans les monocytes, les DCs et les macrophages par des molécules inflammatoires comme le LPS ²⁷⁵⁻²⁷⁷ ;

- Son récepteur spécifique ST2, exprimé par de nombreuses cellules immunitaires, est impliqué dans les réponses de type Th2 et Th1²⁰ ;
- Elle participe également à l'homéostasie tissulaire²⁷⁸, notamment en facilitant la guérison de lésions survenues à la suite d'une infection²⁷⁹ ou d'un traumatisme²⁸⁰.

IV-1-1-3- Dualité d'action des alarmines en cancérologie : exemple d'HMGB1

Plusieurs études montrent que l'expression des alarmines est modifiée dans les cancers^{18,30,281,282}. Il en ressort que les alarmines ont souvent une action à double tranchant, ayant parfois des effets pro- ou antitumoraux^{281,283}. Prenons l'exemple de l'HMGB1 extracellulaire qui illustre tout à fait ces actions opposées.

L'action pro-tumorale la plus marquante d'HMGB1 est sa capacité à promouvoir la néo-angiogenèse. Lorsque la tumeur se développe, une zone ischémique puis nécrotique apparaît en son centre. La nécrose des cellules tumorales entraîne l'arrivée des macrophages pour « nettoyer la zone ». Ces événements provoquent une libération progressive d'HMGB1 dans la tumeur, qui en sa qualité de DAMP, va avoir une action pro-inflammatoire et pro-angiogénique pour favoriser le retour à l'homéostasie^{18,284,285}. HMGB1 recrute et active la mitose et la différenciation des cellules endothéliales. HMGB1 active aussi la sécrétion par les macrophages et les cellules endothéliales de facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF ou l'IL-8^{18,284,285}.

L'autre aspect de l'activité d'HMGB1 concerne sa capacité à promouvoir la réponse immunitaire antitumorale²⁸³. Comme nous l'avons vu précédemment, HMGB1 est un acteur essentiel dans la cascade de la mort immunogénique. Il engage son récepteur TLR4 sur les DCs et donc facilite la présentation des Ags tumoraux aux lymphocytes T CD4 et T CD8^{286,287}. En l'absence d'HMGB1, les anthracyclines et l'oxaliplatine ont une efficacité réduite pour l'induction de la réponse immunitaire spécifique antitumorale²⁸⁷.

Il est donc évident que le rôle joué par HMGB1 dans la tumeur dépend du contexte dans lequel se trouve la dite tumeur : si le développement tumoral suit son cours sans perturbation, HMGB1 aura un rôle pro-tumoral ; si la tumeur est massivement agressée par une thérapie anticancéreuse élicitant la mort immunogénique, HMGB1 sera essentiel pour la réponse immunitaire antitumorale (Figure 28). HMGB1 partage de nombreuses caractéristiques

fonctionnelles avec l'IL-33. Il est donc possible d'imaginer que l'IL-33 soit impliquée dans le phénomène de mort immunogénique.

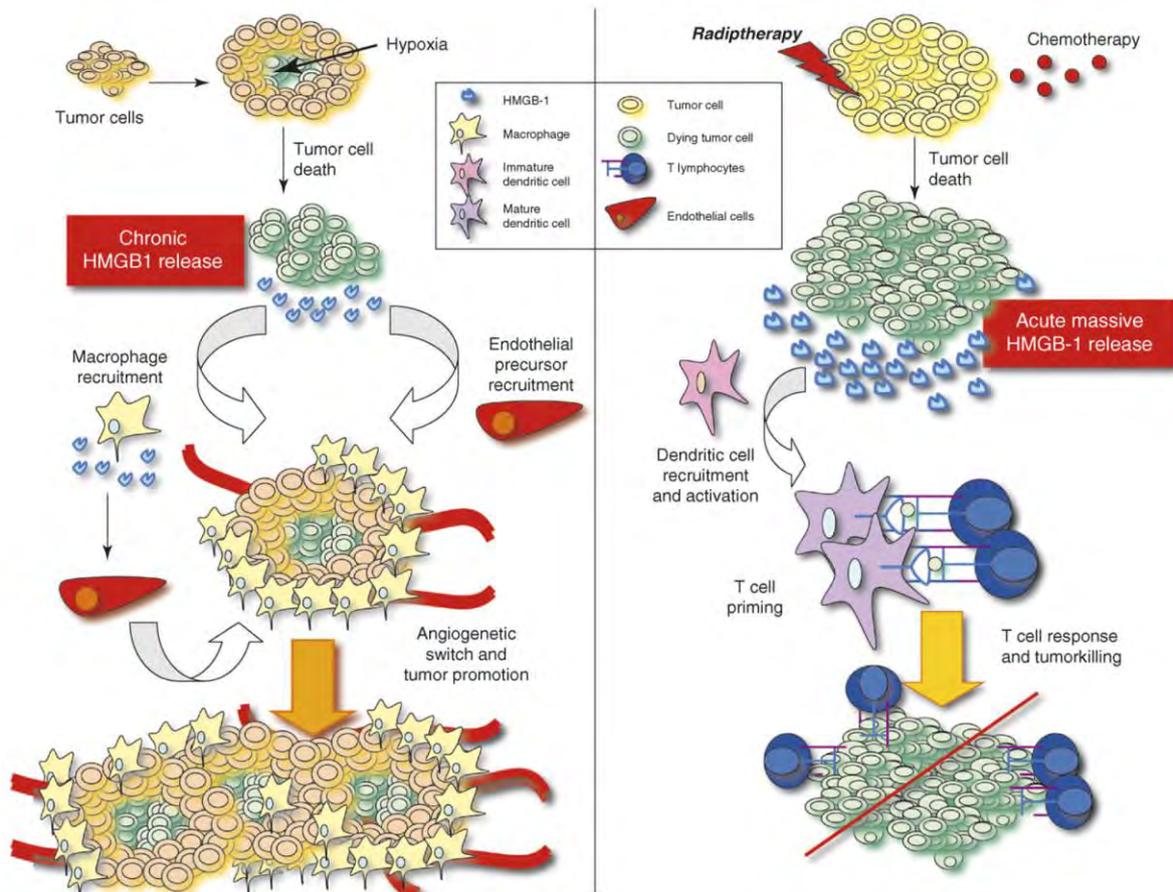


Figure 28 : Dualité d'action d'HMGB1 extracellulaire sur les tumeurs. Extrait de ¹⁸.

IV-1-2- L'IL-33, membre de la famille de l'IL-1

La famille de l'IL-1 (IL-1F) est une famille de cytokines étendue qui joue un rôle très important dans les réactions inflammatoires et pouvant affecter quasiment tout l'organisme. Elle comporte aussi tout un panel de récepteurs qui permettent la transduction du signal ou au contraire, régulent négativement l'action des cytokines. Toutes les cellules immunitaires innées expriment et/ou sont modulées par les cytokines de la famille de l'IL-1. En effet, les récepteurs de l'IL-1F et les TLRs possèdent une analogie structurale et activent des voies de signalisation similaires voire identiques. De plus, les cytokines de l'IL-1F exercent des fonctions adjuvantes dans les réponses immunitaires adaptatives^{20,288}.

IV-1-2-1- Structure générale

L'IL-1F comporte sept ligands avec une activité agoniste pro-inflammatoire : IL-1 α , IL-1 β , IL-18, IL-33, IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ et une cytokine anti-inflammatoire, l'IL-37. Ces ligands sont d'abord synthétisés sous forme de précurseurs intracellulaires puis seront clivés par des enzymes, différentes selon le précurseur, pour obtenir la forme active de la cytokine (ou une forme avec une bioactivité plus importante). Ils sont divisés en trois sous-familles selon la longueur de leur pro-domaine situé avant la partie N-terminale^{20,289}. Tous les membres de l'IL-1F possèdent une séquence consensus située 9 acides aminés en aval de l'extrémité N-terminale. Elle est de type A-X-D, où A est un acides aminés aliphatique : leucine, isoleucine ou méthionine ; X est un acides aminés indifférent et D est l'acide aspartique²⁰. Le motif A-X-D joue un rôle important dans la structure 3D des formes actives des cytokines de l'IL-1F. Effectivement, l'élimination des acides aminés situés en avant de l'extrémité N-terminale permet au premier feuillet β commun à tous les membres de la famille de pouvoir se former²⁸⁸ (Figure 29).

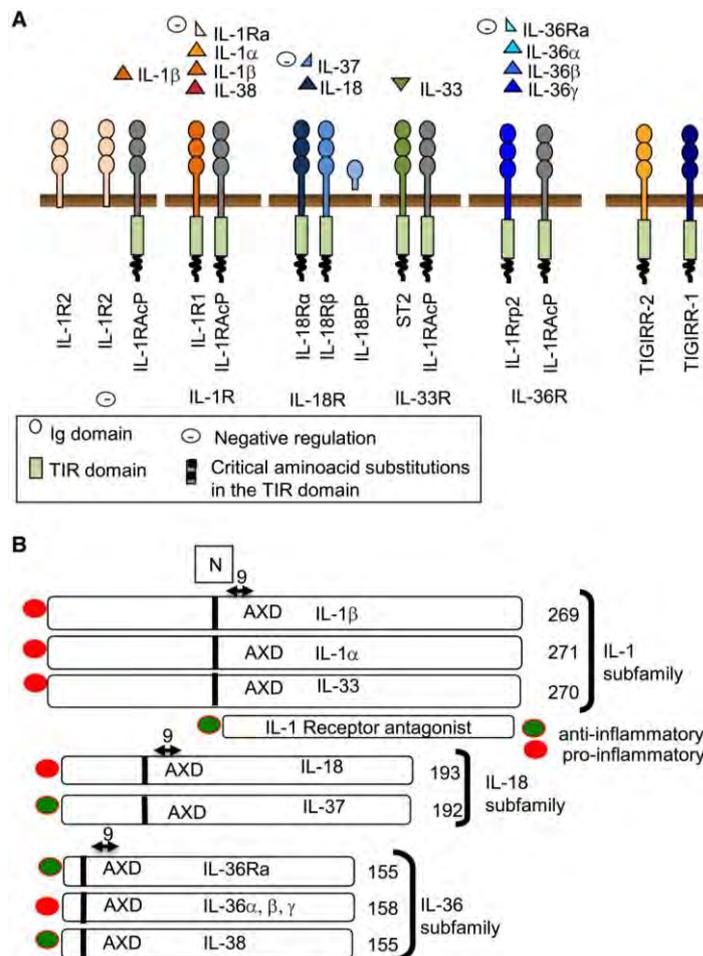


Figure 29 : Ligands et récepteurs de la famille de l'IL-1. Extrait de ²⁰.

Structure protéique de l'IL-33

Le gène codant pour l'IL-33 se situe sur le chromosome 9 chez l'Homme, 19 chez la souris. Deux transcrits du gène sont retrouvés chez la souris, IL-33a et IL-33b qui diffèrent dans la partie 5' mais codent pour la même protéine. Comme les autres cytokines de la famille de l'IL-1, l'IL-33 est synthétisée sous une proforme, ou forme longue de 270 acides aminés (aa) chez l'Homme (266 aa chez la souris) avec un poids moléculaire d'environ 30 kDa. Un variant plus court ne possédant pas l'exon 3 a été identifié, ce qui correspond à une délétion dans la partie N-terminale de 42 acides aminés (Arg74-Gly115) comprenant le site potentiel de clivage par la caspase 1. Malgré cette délétion, ce variant de l'IL-33, spIL-33, est tout à fait capable d'activer les voies de signalisation en aval de ST2²⁹⁰. La stimulation de kératinocytes humains normaux par du TNF- α et de l'IFN- γ induit la production de la forme longue de l'IL-33 et de formes plus courtes de 20 et 25 kDa²⁹¹.

L'IL-33 comporte une séquence d'adressage au noyau non classique dans sa partie N-terminale (aa 1 à 75) qui contient un homéodomaine non conventionnel de liaison à l'ADN « helix-turn-helix » avec deux hélices α et un domaine de liaison à la chromatine entre les acides aminés 40 et 58. La séquence d'acides aminés 65-270, dans laquelle se trouvent les deux sites de liaison au récepteur ST2, constitue le domaine « IL-1-like », responsable de l'activité cytokinique extracellulaire³² (Figure 30).

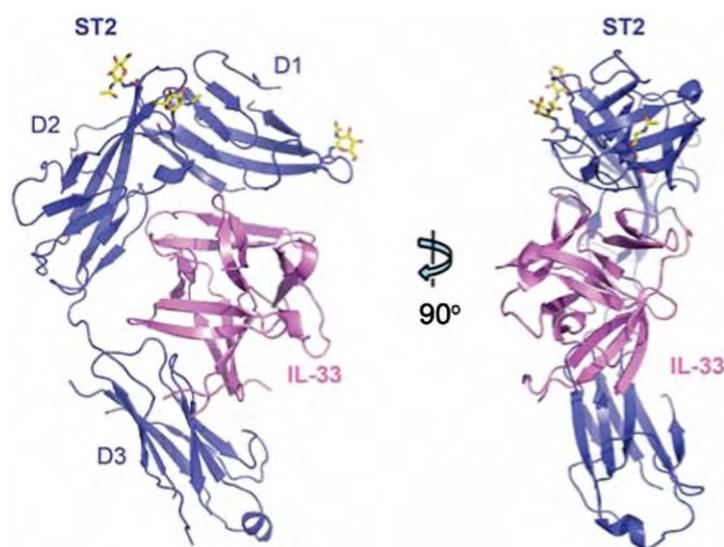


Figure 30 : Structure tri-dimensionnelle de l'IL-33 et de la chaîne α de son récepteur, ST2. Extrait de ³².

IV-1-2-2- Récepteur activateur et voies de signalisation

Le récepteur de l'IL-33 se compose de deux chaînes formant un complexe hétérodimérique : **ST2L** (forme membranaire du récepteur ST2) et **IL-1RAcP** (RAcP = Receptor Accessory Protein). Ces chaînes sont caractérisées par 3 domaines « Ig-like » extracellulaires et possèdent des domaines Toll/Interleukin-1 receptor (TIR) intracellulaires essentiels pour la signalisation (Figure 29). L'IL-33 se fixe d'abord sur ST2L, ce qui entraîne le recrutement d'IL-1RAcP. Ensuite, la transduction du signal se fait *via* la protéine adaptatrice MyD88, comme pour les autres ligands agonistes de l'IL-1F et pour les TLRs. Ceci explique la similitude des réponses observées lors de l'activation des récepteurs de l'IL-1F et des TLRs. Les voies de signalisation activées en aval, impliquant NF- κ B, JNK, p38 et ERK sont impliquées dans la survie, la croissance et la différenciation cellulaire ou encore l'apoptose²⁹² (Figure 31).

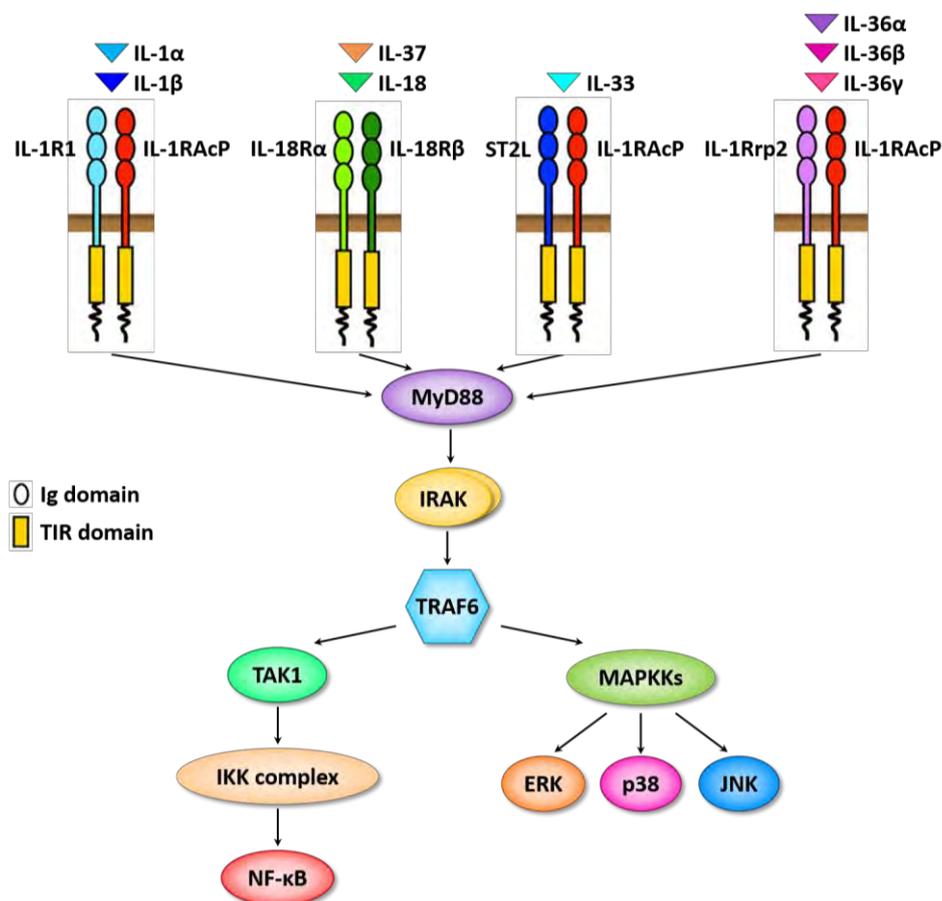


Figure 31 : Voies de signalisation des cytokines de la famille de l'IL-1.

IV-2- Production et libération de l'IL-33

IV-2-1- Localisation tissulaire

L'ARNm de l'IL-33 est trouvé dans de nombreux tissus chez l'Homme et la souris²⁶⁰, principalement dans les cellules musculaires lisses quiescentes ou activées, les fibroblastes dermiques et cardiaques²⁹³, les cellules endothéliales quiescentes^{260,294} et dans les tissus inflammés^{295,296}. Il est fortement exprimé dans les HEVs des organes lymphoïdes secondaires. Ces vaisseaux sont particulièrement présents dans les zones T et dans les zones bordants les follicules contenant les lymphocytes B et font office de porte d'entrée pour les lymphocytes T et B lors de leur extravasation. Les vaisseaux de type HEVs peuvent aussi être retrouvés dans des tissus non lymphoïdes chroniquement inflammés comme dans l'épithélium intestinal dans la maladie de Crohn²⁵⁹.

Chez l'Homme, l'IL-33 est constitutivement exprimée dans les cellules endothéliales des grands et petits vaisseaux dans les tissus sains ainsi que dans les HEVs et les fibroblastes réticulaires dans les zones interfolliculaires T des amygdales saines. Elle est également très présente dans le noyau des cellules exposées à l'environnement comme les kératinocytes, les cellules épithéliales de l'estomac ou les glandes salivaires. On la retrouve aussi abondamment exprimée dans certaines tumeurs solides comme dans le rein, l'estomac, le foie, le pancréas²⁶¹ et dans les ganglions de patients atteints d'hémopathies malignes (Loïc Ysebaert, données non publiées).

Chez la souris, elle est fortement exprimée dans les barrières épithéliales des tissus du vagin, de la peau, des poumons, de l'estomac et des glandes salivaires. En revanche, contrairement à l'Homme, elle n'est pas présente systématiquement dans les cellules endothéliales. Elle est exprimée dans certains organes comme le foie et les alvéoles pulmonaires en cas d'inflammation locale²⁹⁷. Son expression peut être induite dans les cellules sous l'effet d'une exposition aux rayonnements UV²⁹⁸ ou d'un stress biomécanique²⁹³.

IV-2-2- Obtention des formes matures de l'IL-33

L'IL-33 est active sous sa proforme²⁹⁹. Cependant, elle peut être clivée par des enzymes qui permettent d'obtenir des formes matures avec une bioactivité plus puissante.

Il a initialement été proposé que l'IL-33 puisse être clivée par la caspase 1 pour aboutir à sa forme mature²⁶⁰. Néanmoins, il a été montré par la suite que le clivage par la caspase 1 se produit dans le domaine « IL-1-like » et conduit à l'inactivation de l'IL-33. C'est ce phénomène qui se produit durant l'apoptose et empêche son immunogénicité^{299,300}. Les caspases 3 et 7 donnent aussi des produits de clivages inactifs^{300,301}.

La forme mature de l'IL-33 peut être obtenue par l'action de la calpaïne (IL-33₁₁₂₋₂₇₀)^{291,302}. D'autres protéines sont capables de cliver l'IL-33 *in vivo*, dont les sérine-protéases, élastase et cathepsine G exprimées par les neutrophiles activés. Ces protéases génèrent des formes matures de l'IL-33 de différentes longueurs (IL-33₉₅₋₂₇₀, IL-33₉₉₋₂₇₀, IL-33₁₀₉₋₂₇₀) qui sont environ 10 fois plus actives *in vitro* que la forme longue de l'IL-33³⁰³. Les mastocytes sécrètent également des sérine-protéases, chymase et tryptase, qui transforment la forme longue de l'IL-33 en formes matures (IL-33₉₅₋₂₇₀, IL-33₁₀₇₋₂₇₀, IL-33₁₀₉₋₂₇₀)³⁰⁴. La figure 32 résume les processus de production et de maturation de l'IL-33.

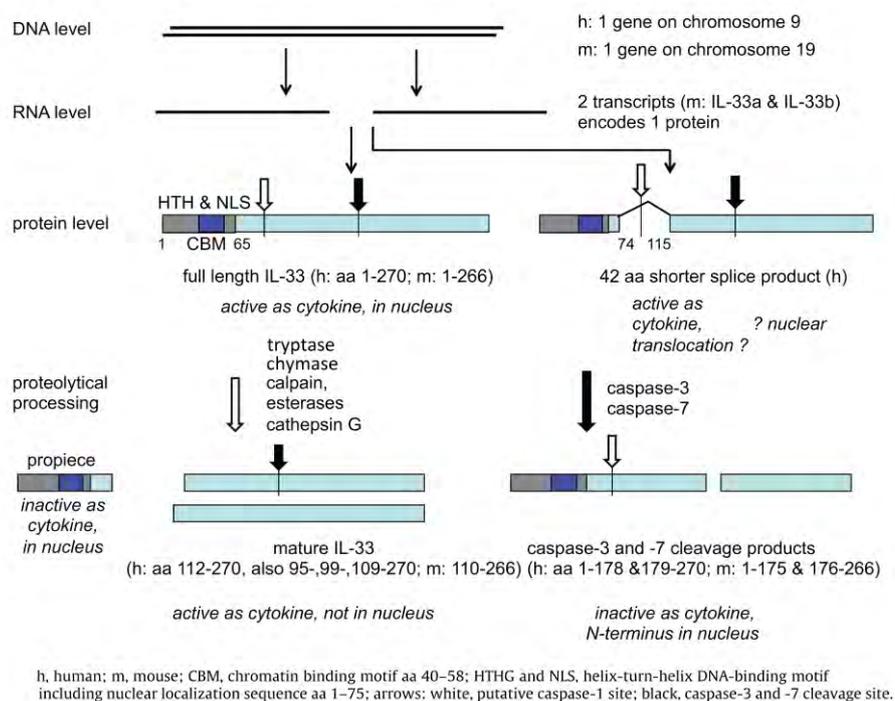


Figure 32 : Expression et maturation de l'IL-33. Modifié depuis ²⁷.

IV-2-3- Libération extracellulaire

L'IL-33 est exprimée constitutivement dans un certain nombre de cellules, où elle reste séquestrée dans le noyau en conditions physiologiques. Elle est donc prête à être libérée de manière passive lorsque la cellule entre en nécrose²⁹⁹. Cependant, la question d'une possible sécrétion de l'IL-33 par des cellules vivantes reste d'actualité.

Plusieurs études rapportent que sous l'influence de signaux de stress, certaines cellules semblent sécréter de l'IL-33 sans perdre leur intégrité morphologique. En effet, la stimulation de cellules épithéliales de cornée avec de l'ATP extracellulaire induit une augmentation de la concentration d'IL-33 dans le milieu de culture³⁰⁵. De la même manière, la concentration d'IL-33 extracellulaire augmente lorsque des cellules gliales ou des astrocytes sont stimulés par une combinaison de PAMPs et d'ATP³⁰⁶. Enfin, l'exposition de souris naïves au champignon allergène *Alternaria alternata* induit une libération de l'IL-33 dans la lumière des voies respiratoires, qui précède la réponse de type Th2. Là aussi, l'ATP extracellulaire est impliqué. La stimulation par *Alternaria* provoque une accumulation de l'ATP extracellulaire, qui à son tour va augmenter la concentration intracellulaire de Ca²⁺ et induire la sécrétion d'IL-33 par activation de récepteurs purinergiques³⁰⁷.

Comme tous les membres de la famille de l'IL-1, l'IL-33 ne possède pas de peptide signal nécessaire pour une sécrétion classique. Sa libération active par des cellules vivantes fait donc intervenir des voies de sécrétion non conventionnelles. Kakkar et ses collaborateurs ont montré récemment sur des lignées cellulaires de fibroblastes que l'IL-33 se trouve à la fois dans le noyau des cellules et stockée dans des vésicules cytoplasmiques attachées à la membrane. Lorsqu'ils appliquent une contrainte mécanique sur les fibroblastes *in vitro* ou *in vivo*, ils provoquent une sécrétion de l'IL-33 sans induction de nécrose³⁰⁸. Ces mécanismes étant encore mal connus, l'étude des voies de sécrétion de l'IL-33 reste à l'étude.

IV-2-4- Régulation négative de l'IL-33

Comme nous l'avons vu, l'IL-33 est exprimée dans de nombreux tissus de l'organisme. Une expression dérégulée de l'IL-33, notamment une surexpression, peut avoir des

conséquences pathologiques graves. C'est pourquoi il existe plusieurs stratégies physiologiques pour limiter l'inflammation induite par cette cytokine (Figure 33).

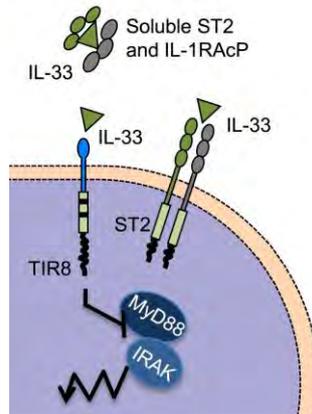


Figure 33 : Mécanismes de régulation négative de l'IL-33. Modifié à partir de ²⁰.

Formes solubles des récepteurs

L'IL-33 peut être régulée négativement par une forme soluble de son récepteur, sST2, qui peut former un complexe stable avec sIL-1RAcP. En se liant à l'IL-33, ce complexe empêche son activité²⁰. sST2 ne possède pas le domaine transmembranaire ni le domaine intracellulaire de ST2L³⁰⁹. Cette forme soluble résulte d'un épissage alternatif et de modifications survenant sur l'extrémité 3' de l'ARNm codant pour ST2L³¹⁰. Peu de données sont connues sur l'expression préférentielle de ST2L ou sST2 mais Caporali et *al.* ont montré que l'activation du récepteur p75 de la neurotrophine, qui appartient à la famille des récepteurs au TNF, augmente l'expression de l'ARNm de sST2³¹¹.

Le régulateur négatif TIR8/SIGIRR

La protéine TIR8, ou SIGIRR (Single Ig IL-1 Related Receptor), possède un seul domaine Ig extracellulaire. Son domaine TIR est conservé mais porte une substitution de deux acides aminés, Ser447 et Tyr536 remplacés par Cys222 et Leu305. Ces deux résidus habituellement conservés dans les domaines TIR sont essentiels pour la transduction du signal. Cette substitution pourrait donc conduire à un signal non conventionnel³¹².

TIR8 est responsable d'une inhibition de NF- κ B et JNK induisant par ce biais une régulation négative de la signalisation de ST2L³¹³. Plusieurs mécanismes sont possibles pour cette régulation négative. D'une part, à la suite d'une stimulation par l'IL-33, TIR8 peut former un complexe avec le récepteur ST2 et ainsi bloquer la signalisation liée à l'IL-33. D'autre part, TIR8 peut interagir par son domaine TIR avec les molécules adaptatrices MyD88 et IRAK nécessaires à la transduction du signal et les séquestrer, les rendant indisponibles pour le récepteur ST2³¹⁴.

Régulation par le protéasome

Il existe un autre mécanisme de régulation négative de l'activité de l'IL-33. Zhao et ses collaborateurs ont montré que FBXL19, une protéine de la famille des E3 ubiquitine ligases, peut se lier spécifiquement à ST2L et induire une polyubiquitinylation et donc sa dégradation par le protéasome. Ce processus permet de limiter l'effet inflammatoire et pro-apoptotique de l'IL-33, impliqué dans la sévérité des lésions pulmonaires survenant dans un modèle murin de pneumonie³¹⁵.

IV-3- Fonctions biologiques de l'IL-33 : une cytokine aux multiples facettes

IV-3-1- L'IL-33, un facteur de transcription ?

Que ce soit chez l'homme ou chez la souris, l'IL-33 endogène est toujours localisée dans le noyau des cellules^{261,297}, en raison de sa séquence de localisation nucléaire non conventionnelle et à son domaine de liaison à la chromatine. Une étude récente a montré que la délétion du domaine de localisation nucléaire affecte gravement l'homéostasie cellulaire. En effet, les souris transgéniques porteuses de la mutation ont un taux d'IL-33 sérique fortement augmenté. Elles subissent une très forte infiltration leucocytaire multi-organique, principalement des éosinophiles, et meurent des conséquences de l'inflammation léthale. Cette étude montre que la localisation nucléaire de l'IL-33 est donc une nécessité pour le contrôle de l'inflammation induite par cette cytokine³¹⁶. Cependant, il est possible que la localisation intranucléaire corresponde à une fonction biologique de l'IL-33, mais ce point est encore mal connu.

L'équipe de Jean-Philippe Girard a montré que le domaine de liaison à la chromatine de l'IL-33 présente de grandes similitudes avec le peptide LANA (latency-associated nuclear antigen) de l'herpesvirus responsable des sarcomes de Kaposi. Comme le peptide LANA, l'IL-33 se fixe dans la poche acide formée par les histones H2A-H2B à la surface des nucléosomes. L'IL-33 pourrait alors réguler la compaction de la chromatine en favorisant les interactions entre nucléosomes³¹⁷. Avec un système de gène rapporteur couplé à la luciférase, ils ont aussi montré que l'IL-33 exerce une activité de répresseur transcriptionnel²⁹⁵. D'autres travaux ont montré que l'IL-33 pourrait au contraire être un inducteur de transcription génique. En effet, l'IL-33 peut se lier dans la région du promoteur de la sous-unité p65 de NF- κ B et augmenter son expression. Ce mécanisme serait impliqué dans l'activation des cellules endothéliales par l'IL-33³¹⁸. Pourtant, l'IL-33 a été rapportée comme étant un marqueur de quiescence dans les cellules endothéliales, et serait perdue lors de leur activation^{294,319}. De plus, une étude a montré que l'IL-33 pourrait se lier dans le noyau à p65 et empêcherait donc l'expression des gènes cibles de NF- κ B par blocage de son interaction avec l'ADN, ce qui est en contradiction avec son rôle inducteur de p65³²⁰.

L'ensemble de ces données montre que l'IL-33 peut influencer de manière complexe l'expression génique et que des investigations complémentaires sont nécessaires pour comprendre réellement sa fonction intranucléaire.

IV-3-2- Bioactivités sur le système immunitaire

IV-3-2-1- L'IL-33 : un puissant inducteur de réponse Th2

Dès son identification comme étant le ligand du récepteur ST2, le rôle inducteur de l'IL-33 dans les réponses de type Th2 a été mis en avant²⁶⁰. Depuis, de très nombreuses études ont confirmé la place centrale qu'elle occupe dans les réponses immunitaires Th2.

Lymphocytes Th2

Le récepteur ST2L avait déjà été décrit depuis longtemps comme étant exprimé de manière stable sur les lymphocytes Th2 mais non présent sur les lymphocytes Th1, même après stimulation par différentes cytokines pro-inflammatoires (IL-2, IFN- γ , IL-1 β , IL-5...) ou des Ac anti-CD3³²¹. L'IL-33 exerce un effet chimio-attracteur sur les lymphocytes Th2³²² et induit dans ces cellules, conjointement avec une activation anti-CD3/CD28, une forte production d'IL-5 et d'IL-

13 *in vitro*²⁶⁰. Associée à du TGF- β , elle induit aussi leur production d'IL-9³²³. Curieusement, elle peut également induire, en combinaison avec une activation antigénique et de l'IL-2, la sécrétion d'IFN- γ par des lymphocytes T polarisés en Th2³²⁴.

Cellules dendritiques

L'effet inducteur de l'IL-33 sur les lymphocytes Th2 s'exerce également de manière indirecte, *via* l'activation des DCs. En effet, le récepteur ST2 est fortement exprimé sur les DCs et lorsqu'on incube des DCs avec de l'IL-33, on observe une augmentation de l'expression du CMH II, CD40, CD80, CD86, OX40L et CCR7 ainsi qu'une augmentation de la production d'IL-6, IL-1 β , TNF et CCL17 mais pas d'IL-12. La co-culture de lymphocytes T CD4 naïfs avec des DCs pré-activées à l'IL-33 provoque une forte production d'IL-5 et d'IL-13 par les lymphocytes T CD4, mais pas d'IL-4 ou d'IFN- γ ^{325,326}.

Les cellules lymphoïdes innées de type 2, ILC2

La découverte récente des ILC2 chez l'Homme, nuocytes chez la souris (ou encore natural helper cells), a aidé à la compréhension de l'impact de l'IL-33 sur les réponses immunitaires de type Th2. Les ILC2 sont des cellules issues du lignage lymphoïde n'exprimant aucun marqueur de ces lignages (Lin⁻) mais tout de même distinctes des progéniteurs lymphoïdes. Elles sont caractérisées par l'expression de c-Kit, Sca-1, IL-7R et ST2. Elles prolifèrent en réponse à la stimulation par l'IL-25 et l'IL-33 et sécrètent de l'IL-5, de l'IL-6 et surtout de l'IL-13 en très grande quantité. La forte expression du récepteur ST2 sur ces cellules en fait des cibles privilégiées pour l'IL-33^{327,328}. Chez l'Homme, ces cellules peuvent être retrouvées dans différents organes, y compris dans le sang périphérique, et sécrètent aussi de l'IL-13 à la suite à une stimulation par l'IL-25 et l'IL-33³²⁹. Depuis leur découverte, de plus en plus d'études montrent leur importance dans le développement de certaines pathologies inflammatoires comme l'asthme^{24,330}.

Macrophages

L'IL-33 a à la fois un effet direct et un effet indirect sur les macrophages. Ces derniers expriment le récepteur ST2 et leur stimulation par l'IL-33 induit leur sécrétion d'IL-13^{331,332}. Chez la souris, l'IL-33 favorise la polarisation des macrophages quiescents en macrophages de type M2 ou macrophages activés alternativement. On retrouve ces résultats *in vitro* en combinant de

l'IL-33 avec de l'IL-13³³³. L'IL-33 modifie également la balance ostéoclastes/M2 dans l'os, où elle favorise la différenciation des monocytes en M2³³⁴. Ces macrophages M2 sécrètent de l'IL-13 et les chimiokines CCL24 et CCL17 impliquées dans la migration des éosinophiles et des lymphocytes Th2. Ils sécrètent également CCL2, CXCL2 et CXCL1. En activant les ILC2 à sécréter de l'IL-13 en grande quantité, l'IL-33 agit indirectement sur la polarisation des macrophages en M2 induite par l'IL-13²⁷⁷.

Polynucléaires éosinophiles

En traitant les souris à l'IL-33, Schmitz et al. ont observé que cette cytokine provoque une éosinophilie importante²⁶⁰. Par la suite, il a été montré que les éosinophiles expriment le récepteur ST2 et que l'IL-33 augmente leur capacité d'adhésion et l'expression de CD11b à leur surface, de manière plus efficace que l'IL-5. En revanche, elle n'induit pas leur dégranulation ni la synthèse de leucotriènes³³⁵. Plusieurs études ont aussi montré que l'IL-33 augmente la survie des éosinophiles^{335,336}. L'IL-33, en activant la voie NF-κB, provoque la sécrétion de l'IL-4 qui va agir de manière autocrine sur les éosinophiles en augmentant leur activation. Mais l'IL-33 induit également l'expression de gènes qui vont influencer les éosinophiles avec des mécanismes indépendants de l'IL-4³³⁷. La stimulation des éosinophiles avec de l'IL-33 exogène *in vitro* induit l'expression d'ICAM-1 sur ces cellules ainsi que la production d'IL-6, d'IL-8 et CCL2³³⁶. Comme nous l'avons vu précédemment, les fibroblastes sont une source majeure d'IL-33. La co-culture de fibroblastes et d'éosinophiles induit les mêmes effets que l'IL-33 exogène, avec en plus la production de CXCL1, CXCL10 et CCL5 de manière contact-dépendante. L'ajout d'IL-33 dans la co-culture augmente encore plus l'expression de ces cytokines et chimiokines³³⁸.

Polynucléaires basophiles

Le récepteur ST2 est exprimé par les basophiles et peut être induit par l'IL-3 et l'IL-33. L'IL-33 augmente l'expression de CD11b et augmente les capacités d'adhésion des basophiles. Seule, elle n'a que peu d'effets sur ces cellules mais agit en synergie avec l'IL-3 et l'activation du Fcε-RI pour promouvoir la sécrétion d'IL4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-13 et de GM-CSF par les basophiles, ainsi que leur dégranulation et leur migration^{323,324,339,340}. Chez la souris, l'IL-33 active directement les basophiles et leur production d'histamine, d'IL-4 et d'IL-6. De plus, *via* un

mécanisme indirect impliquant la chaîne β commune aux récepteurs de l'IL-3, l'IL-5 et du GM-CSF, elle induit leur amplification dans la moelle osseuse³⁴¹.

Mastocytes

L'IL-33 favorise la maturation des progéniteurs CD34⁺ des mastocytes. Sur les mastocytes matures issus de la moelle, l'IL-33 induit directement la production d'un panel important de cytokines, de chimiokines et de molécules inflammatoires dont l'IL-5, l'IL-6, l'IL-10, l'IL-13, le TNF, le GM-CSF, CCL1 ou encore CXCL8^{342,343}. Son effet activateur sur les mastocytes est d'autant plus important lorsqu'on la combine avec un Ag pour lequel les cellules ont été pré-sensibilisées³⁴⁴. Pour les mastocytes résidant dans les tissus, l'adjonction d'IL-3 est nécessaire pour obtenir l'activation des mastocytes et une sécrétion optimale d'IL-13³⁴⁵.

Polynucléaires neutrophiles

En activant les mastocytes à sécréter du TNF, l'IL-33 provoque indirectement un effet chimio-attracteur sur les neutrophiles. *In vivo*, le traitement de souris sauvages par injections intra-péritonéales d'IL-33 résulte en une infiltration de neutrophiles dans le péritoine, non retrouvée dans les souris ne possédant pas de mastocytes³⁴⁶. Le recrutement des neutrophiles par l'IL-33 est aussi partiellement dépendant de CXCL1, sécrétée en réponse à l'IL-33 par les macrophages M2^{347,348}. En plus de son effet attracteur, l'IL-33 peut aussi agir directement sur les neutrophiles. Elle empêche la diminution d'expression de CXCR2, récepteur crucial pour la migration des neutrophiles, qui se produit après l'activation par du LPS³⁴⁹.

Lymphocytes B

Comme l'IL-33 est un puissant inducteur de cytokines de type Th2, il est logique de penser qu'elle peut influencer la réponse humorale. Effectivement, une étude montre que l'IL-33 peut induire spécifiquement la prolifération et la production d'IgE par les lymphocytes B et que cette réponse est dépendante de l'IL-4³⁵⁰. Une sous-population de lymphocytes B, les lymphocytes B1, minoritaires parmi les B totaux, expriment le récepteurs ST2 lorsqu'ils sont naïfs. L'IL-33 active la prolifération des lymphocytes B1 et augmente leur expression d'IL-5, d'IL-13 et d'IgM *in vitro* et *in vivo*, selon un mécanisme IL-5-dépendant. Les lymphocytes T et les mastocytes sont

impliqués dans cette réponse, puisque les souris déficientes pour ces cellules voient leurs lymphocytes B1 moins activés en présence d'IL-33³⁵¹.

L'ensemble de ces données montrent à quel point l'IL-33 joue un rôle central dans l'induction des réponses inflammatoires de type Th2. La figure 34 résume l'ensemble de son action inflammatoire dans ce type de réponses immunitaires.

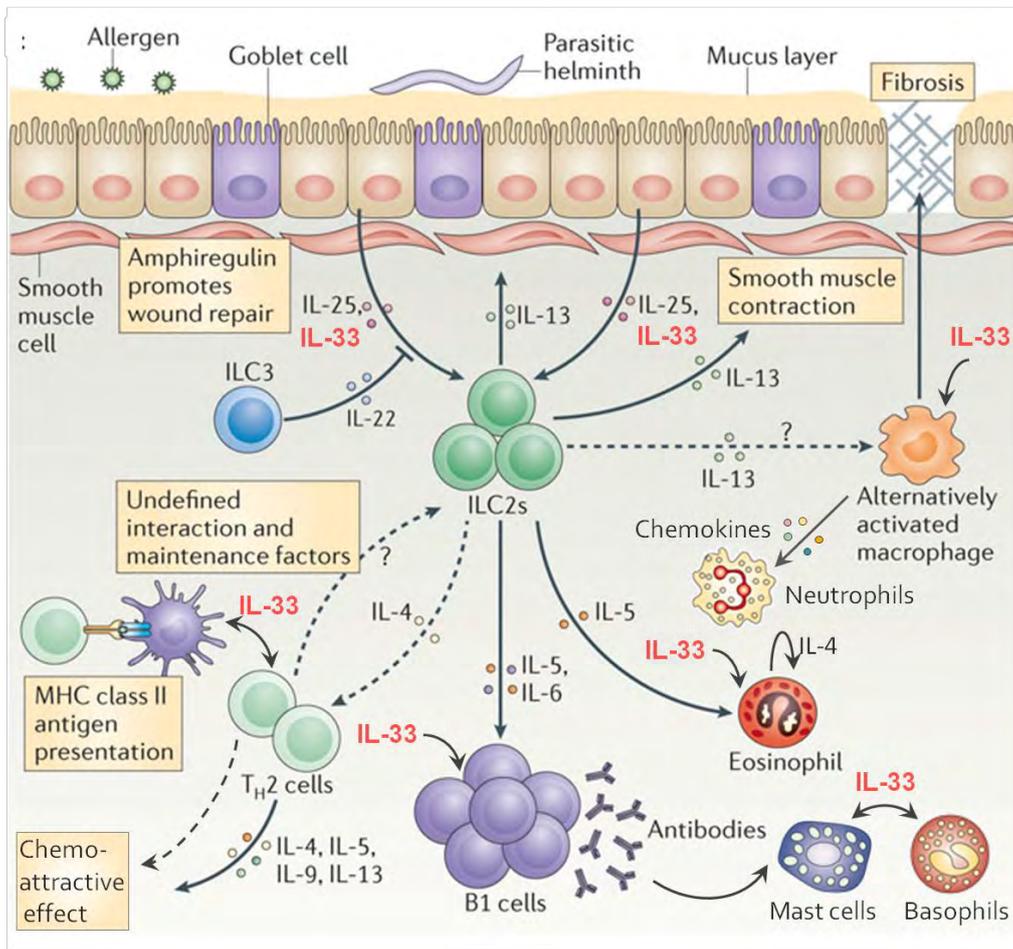


Figure 34 : L'IL-33 dans la réponse inflammatoire de type Th2. Modifié depuis ²⁴.

IV-3-2-2- Activation des lymphocytes régulateurs

Bien que ce soit un médiateur de réponses inflammatoires, l'IL-33 peut, de manière surprenante, soutenir des réponses anti-inflammatoires, notamment par augmentation des lymphocytes Tregs³⁵².

Ces propriétés régulatrices ont notamment été étudiées dans les allogreffes cardiaques. Deux études publiées en 2011 ont montré que l'administration d'IL-33 chez la souris, en plus de provoquer une réponse Th2, augmente également la proportion de lymphocytes Tregs CD25^{hi} Foxp3⁺ et de MDSCs. Après une greffe cardiaque allogénique, le traitement des souris par IL-33 conduit à une meilleure tolérance de la greffe, associée à une augmentation de la survie globale. L'IL-33 induit la réponse Th2 (IL-5, IL-13), diminue la production d'IL17 et le nombre de lymphocytes T CD8 IFN- γ ⁺. Elle diminue le taux global des lymphocytes dans le greffon mais augmente le nombre de lymphocytes Tregs et de MDSCs, ainsi que la concentration d'IL-10. De plus, elle diminue le taux de lymphocytes B et aussi la concentration d'Ac anti-greffon dans le sérum et dans la greffe^{353,354}. Dans un modèle mimant la maladie de Crohn chez la souris, l'administration d'IL-33 permet de diminuer les symptômes d'inflammation colique. Là aussi, cet effet est dû à l'induction de la réponse Th2 et des Tregs. Les auteurs ont aussi remarqué une augmentation des DCs CD103⁺ inductrices de Tregs dans les ganglions mésentériques et la lamina propria des souris traitées à l'IL-33³⁵⁵. Récemment, Matta et *al.* ont montré que les DCs conventionnelles CD11c⁺ stimulées par l'IL-33 sécrètent de l'IL-2 qui va aider spécifiquement à l'expansion des Tregs ST2⁺. Ceci se produit en l'absence de maturation des DCs, et l'IL-2 sécrétée augmente l'expression de ST2 à la fois sur les DCs et sur les Tregs³⁵⁶. Les voies de signalisation activées par l'IL-33 dans les lymphocytes T de l'intestin stimulent la réponse Treg de plusieurs manières. D'une part, l'IL-33 induit la production de TGF- β nécessaire à l'induction des Tregs et d'autre part, elle fournit un signal qui permet le maintien et la survie des Tregs³⁵⁷.

La tolérance périphérique peut aussi être assurée par les lymphocytes B immunosuppresseurs dits B régulateurs (Bregs). Chez des souris transgéniques IL-10-déficientes, qui développent spontanément une maladie inflammatoire de l'intestin, l'administration d'IL-33 provoque une exacerbation des symptômes. Pourtant, chez les souris sauvages, l'IL-33 induit une protection contre la maladie. Sattler et *al.* ont identifié une population particulière de lymphocytes B dits Bregs responsables de l'effet protecteur. Après isolation, ces lymphocytes Bregs sont capables de supprimer l'expansion et l'activation des cellules effectrices *in vitro*, et de protéger, après transfert adoptif, les souris IL-10^{-/-} contre le développement de la colite.

L'ensemble de ces travaux met en évidence à quel point l'IL-33 possède des effets variés. Il n'est donc pas étonnant qu'on la retrouve impliquée dans un grand nombre de pathologies, avec des effets délétères ou au contraire, des effets protecteurs.

IV-3-2-3- L'IL-33 est aussi inductrice de réponse immunitaire Th1

Même si l'IL-33 participe essentiellement à la réponse immunitaire Th2, elle peut aussi soutenir et induire des réponses immunitaires de type Th1 car elle a un impact sur les fonctions cellulaires des cellules NK, NKT et des lymphocytes T CD8.

Lymphocytes T CD8

Les lymphocytes T CD8 expriment fortement le récepteur ST2 et cette expression est dépendante du facteur de transcription caractéristique des cellules Th1 T-bet. L'IL-33 augmente la production d'IFN- γ des lymphocytes T CD8 activés par un Ag³⁵⁸. De plus, l'IL-33 agit en synergie avec l'IL-2 ou l'IL-12 pour augmenter l'activation ainsi que la production d'IFN- γ par les lymphocytes T CD8^{358,359}. Elle augmente aussi leurs capacités cytotoxiques³⁶⁰. L'IL-33 joue aussi un rôle très important dans l'établissement de la mémoire immunitaire par les lymphocytes T CD8. En effet, la différenciation des lymphocytes T CD8 en lymphocytes effecteurs mémoires résidant dans les tissus dépend de la diminution, induite notamment par l'IL-33, de l'expression d'un facteur de transcription, KLF2³⁶¹. C'est l'une des raisons qui font de l'IL-33 un très bon adjuvant pour la vaccination. Plusieurs équipes ont étudié la capacité de l'IL-33 à augmenter la réponse immunitaire dans les vaccins à ADN. Adjointe au vaccin ADN, l'IL-33 favorise l'expansion clonale des lymphocytes T CD8, induit leur différenciation en cellules effectrices plurifonctionnelles (sécrétion d'IFN- γ et cytotoxicité) et augmente la réponse globale cytotoxique induite par la vaccination³⁶². En plus de son effet inducteur sur les lymphocytes T CD8, elle augmente aussi l'activation des lymphocytes T CD4 *in vivo*, dans des modèles de vaccination ADN contre les virus et de vaccination thérapeutique contre les tumeurs liées à HPV^{363,364}.

Cellules NK et iNKT

L'IL-33 seule modifie peu les fonctions des cellules NK et iNKT. Par contre, en présence d' α -galactocéramide, un Ag activateur des iNKT, l'IL-33 potentialise leur sécrétion de cytokines

dont l'IL-2, le TNF- α et l'IFN- γ *in vitro* de manière dose-dépendante³²⁴. *In vivo*, cela se traduit par un doublement du nombre d'iNKT dans la rate et dans le foie après le traitement des souris par l'IL-33³⁶⁵. En combinaison avec l'IL-12, elle induit la production d'IFN- γ par les cellules iNKT et les cellules NK, que ce soit sur des cellules humaines ou sur des cellules murines^{324,365}. De plus, elle augmente l'activité cytotoxique des cellules NK en co-culture avec des cellules cibles *in vitro*³⁶⁰.

Ces données montrent qu'en parallèle de son effet inducteur des réponses Th2, l'IL-33 peut efficacement potentialiser les réponses immunitaires de type Th1 (Figure 35), ce qui lui confère un intérêt majeur dans les réponses anti-infectieuses et antitumorales.

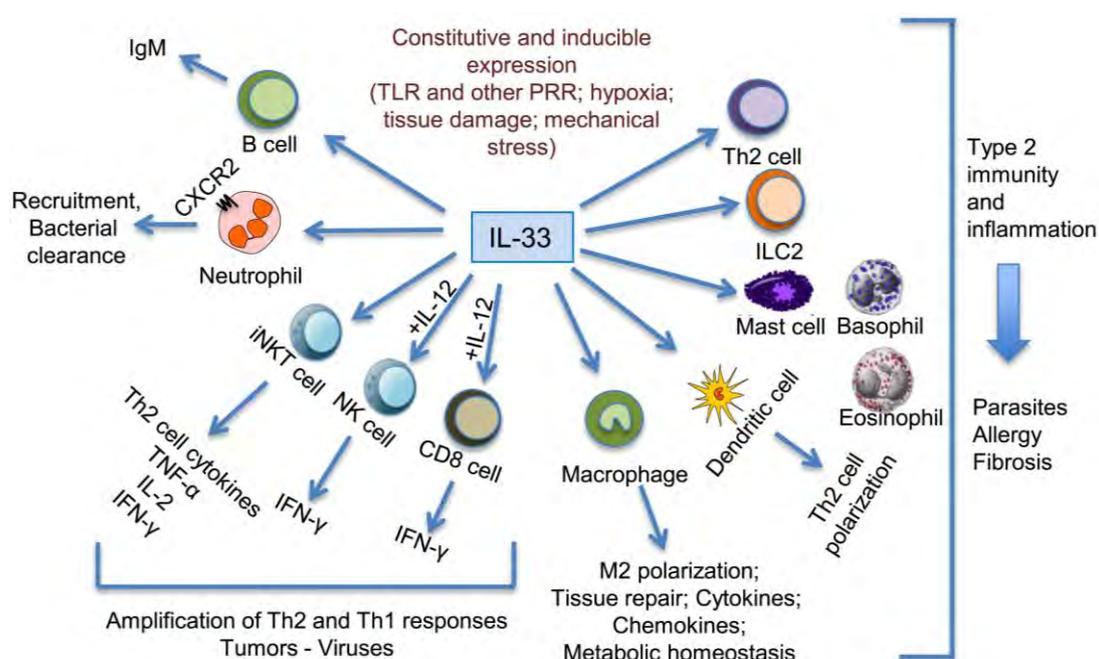


Figure 35 : Bioactivités de l'IL-33 sur les cellules du système immunitaire. Extrait de ²⁰.

IV-4- L'axe IL-33/ST2 en physiopathologie

L'IL-33 affecte de manière directe ou indirecte l'ensemble du système immunitaire. Selon le contexte inflammatoire et l'environnement cellulaire dans lesquels elle se trouve, elle peut induire des réponses inflammatoires de type Th2 ou Th1, ou au contraire promouvoir des réponses anti-inflammatoires. Elle peut tenir une place très importante dans certaines affections. Nous verrons ici les pathologies principales dans lesquelles elle joue un rôle, en

mettant toutefois l'accent sur les cancers. Son rôle protecteur dans les allogreffes ayant déjà été discuté, il ne sera pas présenté ici.

IV-4-1- Pathologies inflammatoires et auto-immunes

C'est le type de pathologies pour lesquelles l'IL-33 est le plus étudiée.

L'IL-33 dans les hépatites fulminantes

La concanavalin A (Con A) est utilisée pour induire une hépatite fulminante expérimentale. Elle provoque une nécrose massive des hépatocytes et une activation des cellules immunitaires qui miment la pathologie se déroulant chez l'Homme³⁶⁶. L'axe IL-33/ST2 exerce un rôle protecteur dans cette pathologie. Effectivement, les souris déficientes pour le récepteur ST2 subissent des lésions plus sévères, avec une infiltration plus forte de cellules mononucléées : lymphocytes T CD4 et CD8, cellules NK et NKT et macrophages et une augmentation des cytokines pro-inflammatoires TNF- α , IFN- γ et IL-17 dans le sérum. En revanche, les souris sauvages développent une pathologie moins sévère avec moins d'infiltration leucocytaire mais avec un nombre plus important de lymphocytes Tregs et une production plus importante d'IL-4. De plus, l'IL-33 inhibe la caspase 3, ce qui inhibe l'expression de la protéine pro-apoptotique BAX et augmente la protéine anti-apoptotique Bcl-2³⁶⁷.

L'asthme et les allergies

Des études GWAS (genome-wide association studies) réalisées récemment ont montré que les gènes codant pour l'IL-33 et ST2 sont des gènes de susceptibilité pour l'asthme. Ce sont d'ailleurs les seuls gènes qui ressortent systématiquement dans ces études. Dans les modèles murins d'asthme ou chez les patients, le taux d'IL-33 et de sST2 est toujours augmenté. L'IL-33 active directement ou indirectement toutes les cellules impliquées dans le développement de l'asthme (Figure 34), ce qui lui donne un rôle central dans la pathologie. Pourtant, les souris déficientes pour le récepteur ST2 ne sont pas protégées contre l'inflammation des voies respiratoires induite par l'OVA, montrant que l'IL-33 n'est pas le seul facteur impliqué dans ces mécanismes inflammatoires. Néanmoins, elle reste l'un des acteurs principaux dans le développement de l'asthme³⁶⁸.

L'IL-33 est aussi impliquée dans les allergies. Une étude a montré que l'IL-33 est rapidement libérée dans le mucus nasal après exposition à un allergène. Les souris pré-sensibilisées à l'allergène subissent une inflammation avec une phase aiguë (éternuements) et une phase tardive avec accumulation des éosinophiles et des basophiles. L'IL-33 favorise la production d'histamine et de chimiokines qui induisent l'accumulation des cellules immunitaires dans l'épithélium nasal. Par contre, les souris IL-33^{-/-} sont protégées contre cette inflammation, ce qui montre que l'IL-33 est très importante dans la physiopathologie des rhinites allergiques³⁶⁹. Dans la dermatite atopique, l'IL-33 provoque la migration des ILC2 sur le site inflammatoire, et les active à sécréter de l'IL-5 et de l'IL-13 qui sont à la base du développement des lésions³⁷⁰.

Les maladies auto-immunes liées aux lymphocytes T

L'IL-33 a montré un effet protecteur dans plusieurs modèles de maladies auto-immunes. Dans un modèle de diabète de type 1 induit par de multiples doses faibles de streptozotocine, la délétion du récepteur ST2 chez les souris BALB/c naturellement résistantes augmente la susceptibilité au diabète. Les souris ST2^{-/-} développent des symptômes caractéristiques avec une hyperglycémie, une infiltration des cellules immunitaires et une perte des cellules β des îlots de Langerhans³⁷¹. Le traitement par de très faibles doses de cyclophosphamide élimine les lymphocytes Tregs chez les souris ST2^{-/-}, et augmente l'infiltration des lymphocytes T CD4 IFN- γ ⁺ TNF- α ⁺ et T CD8 ainsi que la production d'IL-17. Cela montre que les Tregs sont impliqués dans la résistance au diabète conférée par l'IL-33³⁷².

Le modèle d'Encéphalomyélite Allergique Expérimentale (EAE) est couramment utilisé pour étudier la sclérose en plaque chez les rongeurs. Comme pour le diabète, les souris BALB/c sont naturellement protégées contre la pathologie alors que les souris C57Bl/6 γ sont susceptibles. Mais la délétion du récepteur ST2 inhibe la résistance au développement de l'EAE chez les souris BALB/c, qui développent les mêmes symptômes que les souris C57Bl/6. La délétion de ST2 s'accompagne d'une augmentation des lymphocytes T CD4 pathogéniques qui migrent dans le système nerveux central. *In situ*, il se produit une augmentation de la production d'IFN- γ , de TNF- α , d'IL-17 et de GM-CSF qui sont des médiateurs de la maladie³⁶⁶.

IV-4-2- Maladies cardiovasculaires

L'IL-33 a suscité l'intérêt dans les affections cardiovasculaires lorsqu'il a été mis en évidence que sST2 est augmenté dans les souris et chez l'humain après un infarctus du myocarde. Chez l'Homme, le taux de sST2 est corrélé à une insuffisance ventriculaire gauche et à un mauvais pronostic³⁷³. Dès lors, le taux de sST2 a été suggéré comme un biomarqueur de la fonction cardiaque³⁷⁴. L'IL-33 antagonise l'action de l'angiotensine II et l'hypertrophie des cardiomyocytes induite par la phényléphrine. Chez la souris, elle protège contre l'hypertrophie ventriculaire et la fibrose liées à l'hypertension artérielle²⁹³. Elle a aussi un rôle protecteur contre l'athérosclérose. En effet, les souris ApoE^{-/-} placées sous régime riche en graisses développent des plaques sévères athérosclérotiques, tandis que les souris traitées à l'IL-33 sont beaucoup moins atteintes, avec des lésions de moindre importance. Les souris traitées à l'IL-33 produisent des Ac dirigés contre les LDL (low density lipoprotein). A l'opposé, les souris auxquelles on administre du sST2 développent des plaques encore plus sévères²⁹⁶. Ces données montrent que l'IL-33 est très importante dans la protection contre les affections cardiaques.

IV-4-3- Immunité anti-infectieuse

L'IL-33 est largement exprimée par les cellules épithéliales et les cellules endothéliales des tissus constituant les voies d'entrée des microbes. Comme elle est libérée lors d'un dommage cellulaire, elle est l'un des premiers médiateurs de l'inflammation présents sur le site de l'infection³⁶⁶.

L'IL-33 est largement impliquée dans la réponse anti-parasitaire. En induisant la réponse Th2 et la sécrétion d'IL-13, l'IL-33 induit aussi l'hyperplasie des cellules caliciformes. Dans les infections à *Nippostrongylus brasiliensis*, ces mécanismes conduisent à l'expulsion des helminthes en l'absence de réponse T effective^{327,328,375}. D'ailleurs, les souris déficientes en IL-33 ne sont pas capables de contrôler l'infection³²⁸. Dans les souris infectées à *Strongyloides venezuelensis*, la production d'IL-5 par les ILC2 induit une éosinophilie qui contribue à l'expulsion des parasites des poumons³⁷⁶. L'effet inducteur de réponse Th2 de l'IL-33 a également été impliqué dans d'autres infections parasitaires³⁷⁷. Par contre, elle a un effet délétère dans les infections à *Leishmania donovani* où la réponse Th1 est essentielle pour contrôler l'infection.

L'IL-33 tient aussi une place importante dans les réponses anti-virales et anti-bactériennes. L'expression d'IL-33 est induite dans de nombreuses infections bactériennes et virales³⁷⁸. Par exemple, dans les infections à *Influenza virus*, l'IL-33, très largement exprimée dans les poumons, provoque la production de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α , IFN- γ et IFN- β et promeut la réponse anti-virale³⁷⁹. Dans un modèle de sepsis expérimental, l'IL-33 induit la migration des neutrophiles au site de l'infection ce qui provoque l'élimination complète des bactéries³⁴⁹.

Globalement, l'IL-33 a un rôle bénéfique dans la réponse immunitaire contre les infections de toutes sortes, qu'elles soient parasitaires, virales, bactériennes ou fongiques³⁷⁸.

IV-4-4- IL-33/ST2 et cancers

L'impact de l'IL-33 dans le développement et la progression ou la régression des pathologies cancéreuses est aujourd'hui de plus en plus étudié. En effet, son rôle crucial dans l'inflammation de type Th2 amène les scientifiques à se demander quel est son implication dans la physiopathologie du cancer.

IV-4-4-1- IL-33 sérique : corrélation avec la maladie ?

Une des approches a été de mesurer le taux plasmatique d'IL-33 ou sST2 chez les patients atteints de cancers. Certaines études montrent une corrélation entre le taux sérique d'IL-33 ou de sST2 et des cas de tumeurs bénignes ou malignes de nature très diverse, tels que des léiomyomes, des cancers gastriques. Dans les cancers du sein, l'IL-33 sérique est corrélée avec divers critères de gravité de la maladie comme les métastases ou le grade de la pathologie³⁸⁰⁻³⁸³. En revanche, dans les cancers du poumon non à petites cellules ou dans les hépatocarcinomes, le taux sérique d'IL-33 ou de sST2 ne semble pas vraiment être un critère fiable dans la caractérisation de la pathologie dans la mesure où les études ont donné des résultats contradictoires, montrant tantôt une corrélation positive, tantôt aucune corrélation³⁸⁴⁻³⁸⁷. Dans le cas des hémopathies malignes, il semble y avoir une corrélation négative entre le taux d'IL-33 dans le sérum et la pathologie^{388,389}. Un taux plus bas d'IL-33 sérique a même été associé avec les stades avancés de la maladie dans le myélome multiple³⁹⁰. Une méta-analyse portant sur huit études ayant mesuré le taux d'IL-33 dans le sérum des patients atteints de différents cancers a

montré qu'en effet, le taux d'IL-33 est plus élevé chez les patients atteints de cancers que chez les sujets sains, mais aucune corrélation n'a pu être établie avec les stades de la maladie, les métastases ou le temps de survie global des patients³⁹¹.

IV-4-4-2- L'IL-33 dans le microenvironnement tumoral

Plusieurs études montrent que l'IL-33 est présente dans le microenvironnement tumoral, exprimée par les cellules du stroma³⁹² ou les cellules cancéreuses elles-mêmes^{382,384,392-394}. Elle est aussi exprimée dans le noyau des cellules endothéliales des vaisseaux classiques tumoraux ou des HEVs^{261,394}. Le récepteur ST2 a lui aussi été détecté sur plusieurs types de cellules cancéreuses humaines ou de rongeurs³⁹⁵⁻³⁹⁸.

De par son action pro-inflammatoire, l'IL-33 peut influencer la production de facteurs solubles par les cellules tumorales, comme l'IL-6 et l'IL8 connues pour leur rôle dans la migration et l'angiogenèse. Dans la leucémie myéloïde chronique, les progéniteurs leucémiques CD34⁺ sont ciblés par l'IL-33 qui entraîne leur prolifération et leur production de cytokines IL-6 et IL-8³⁹⁸. Ces cytokines sont aussi induites par l'IL-33 dans une lignée de carcinome pancréatique métastatique³⁹⁹. De plus, l'axe IL-33/ST2 est responsable de l'augmentation de la production d'IL-6, CXCR4, MMP-2 et MMP-9 liés à l'invasion, la dissémination et la formation de métastases dans les cancers colorectaux³⁹³.

L'IL-33 peut également modifier la composition cellulaire du stroma tumoral. Dans les carcinomes épidermoïdes de la langue, la surexpression de l'IL-33 et ST2 dans les tissus tumoraux entraîne l'augmentation de la densité en mastocytes et en microvaisseaux dans le stroma tumoral. Ceci est associé à un mauvais pronostic pour les patients avec une fréquence plus élevée de métastases⁴⁰⁰. Cet effet pro-métastatique est retrouvé dans un modèle de carcinome mammaire chez la souris et chez les patients atteints de carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou (CETC)³⁹². Chez la souris, il est associé à une accumulation dans le microenvironnement de MDSCs, d'ILC2 et de lymphocytes Tregs avec une augmentation splénique de macrophages de type M2⁴⁰¹. Dans les CECT, Chen et *al.* ont montré que l'IL-33 surexprimée dans les CAFs et les cellules cancéreuses est primordiale pour la migration et l'invasion des cellules tumorales et que le blocage de son activité diminue l'agressivité de ces cancers³⁹².

IV-4-4-3- L'IL-33 et la réaction immunitaire antitumorale

En modifiant le microenvironnement, l'IL-33 influence inévitablement la réaction immunitaire antitumorale. Ainsi, dans les études menées par Jovanovic et *al.* sur le cancer mammaire chez la souris, l'IL-33 exogène diminue la proportion de cellules NK intratumorales. La délétion du récepteur ST2 dans ces souris entraîne une augmentation sérique d'IL-17, d'IFN- γ , de TNF- α et une diminution d'IL-4, avec une augmentation splénique des cellules NK productrices d'IFN- γ . *In vitro*, les cellules NK et les lymphocytes T CD8 issus de rate de souris ST2^{-/-} sont plus cytotoxiques que les splénocytes issus de souris sauvages⁴⁰¹⁻⁴⁰³.

Cependant, l'IL-33 n'exerce pas toujours un effet négatif sur le microenvironnement et les cellules cancéreuses. Au contraire, certaines études montrent que l'IL-33 peut soutenir fortement la réaction immunitaire antitumorale. En utilisant un modèle de souris transgéniques où l'IL-33 est exprimée de manière constitutive, Gao et *al.* ont montré que l'IL-33 diminue les métastases dans les mélanomes ou le carcinome du poumon de Lewis. Elle augmente l'infiltration intratumorale et la cytotoxicité des cellules NK et des lymphocytes T CD8. De plus, la déplétion de ces effecteurs élimine l'effet protecteur induit par l'IL-33 contre les métastases. *In vitro*, le traitement des cellules NK et des T CD8 issus de souris sauvages par de l'IL-33 recombinante induit également leur expression de CD69 et leur cytotoxicité, *via* l'activation de NF- κ B³⁶⁰.

L'IL-33 peut aussi avoir un effet immunoadjuvant dans la vaccination thérapeutique des cancers liés à une infection virale comme le papillomavirus (HPV). Dans une étude réalisée chez la souris, Villarreal et ses collègues ont étudié l'action immunoadjuvante de l'IL-33 sous forme native ou mature sur la vaccination ADN contre HPV. Lors de la vaccination, les deux isoformes d'IL-33 augmentent les réponses Ag-spécifiques des lymphocytes T CD4 et T CD8 avec une forte dégranulation des lymphocytes T CD8. Cette activation des lymphocytes T s'accompagne d'une forte réponse IFN- γ sans modification des niveaux d'IL-4 et d'IgE. De plus, l'IL-33 augmente la proportion de lymphocytes T CD8 mémoires. En outre, l'IL-33 influence l'immunité humorale en augmentant les IgG spécifiques anti-HPV. Au final, l'ajout d'IL-33 comme immunoadjuvant lors de la vaccination thérapeutique conduit à une régression complète des tumeurs *in vivo*³⁶⁴.

Ces dernières études montrent que l'IL-33, bien qu'ayant des effets multiples sur les cellules exprimant le récepteur ST2, peut avoir une influence très positive sur la réponse immunitaire antitumorale, si tant est que cette réponse immunitaire soit polarisée vers un type Th1. Dans ce cas, l'IL-33 démontre qu'elle peut être un atout dans les vaccinations thérapeutiques et les immunothérapies antitumorales.

V- LES IMMUNOTHERAPIES ANTICANCEREUSES

Les thérapies conventionnelles du cancer, incluant résection tumorale, chimiothérapie et radiothérapie possèdent un certain nombre de limitations : tumeurs inopérables, efficacité limitée ou effets indésirables importants sont autant d'arguments poussant à envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques antitumorales. En ce sens, les immunothérapies anticancéreuses représentent une alternative prometteuse pour cibler plus spécifiquement les tumeurs chimiorésistantes, la maladie résiduelle après traitement, ou encore les sites métastatiques difficiles d'accès tout en limitant la toxicité de la thérapie. Dans certains cancers, l'immunothérapie anticancéreuse semble même être le traitement le plus efficace et a apporté une véritable avancée thérapeutique, notamment dans les mélanomes métastatiques¹⁹².

V-1- Immunothérapies passives

Les immunothérapies passives correspondent à la génération *ex vivo* de molécules ou de cellules effectrices qui vont cibler soit directement les cellules cancéreuses, soit le microenvironnement tumoral immunosuppresseur. Ces thérapies requièrent l'identification d'Ags tumoraux ou de molécules surexprimées dans les tumeurs faisant d'elles de bonnes cibles thérapeutiques. Ce type de thérapies regroupe donc les AcMo thérapeutiques et le transfert adoptif de lymphocytes T cytotoxiques (ACT)¹⁹³.

V-1-1- Les anticorps monoclonaux thérapeutiques

Les AcMo représentent la première avancée majeure en immunothérapie dans les traitements du cancer. Leur première introduction couronnée de succès en oncologie remonte à la fin des années 1990, avec l'approbation par la Food and Drug Administration (FDA) du rituximab (RTX, anti-CD20) et du trastuzumab (TTZ, anti-HER2) dans le traitement des hémopathies malignes à cellules B et du cancer du sein respectivement. Depuis cette époque, l'avancée des connaissances en oncologie associée au développement des techniques pour la production de molécules transgéniques ont permis de générer beaucoup d'autres AcMo ainsi que des molécules dérivées comme les ADCs (antibody-drug conjugates) ou les ARC (antibody radioconjugates)¹⁹⁴.

V-1-1-1- Structure et mécanismes d'action

A l'heure actuelle, les AcMo majoritairement présents en clinique sont de classe IgG1. Ces AcMo se composent de deux chaînes lourdes (H : heavy) et de deux chaînes légères (L : light) (Figure 36). Les deux types de chaînes comportent un ou plusieurs fragments constants (C_H , C_L) et un fragment variable (V_H , V_L). Ces derniers portent les régions ultra-variables ou CDRs (complementarity-determining regions) qui assurent la reconnaissance de l'épitope présent sur l'Ag cible. Il existe différents types d'AcMo, avec une nomenclature spécifique (-suffixe) selon les différences d'origine de leurs parties variables et constantes. Les premiers AcMo étaient d'origine entièrement murine (-momab). Puis ont suivi les AcMo chimériques, où les fragments constants sont d'origine humaine tandis que les fragments variables sont d'origine murine (-ximab). Il existe aussi des Ac humanisés où la quasi-totalité de la structure est d'origine humaine sauf les CDRs qui sont d'origine murine (-zumab). Enfin, on peut aussi trouver des AcMo intégralement humains (-mumab)¹⁶.

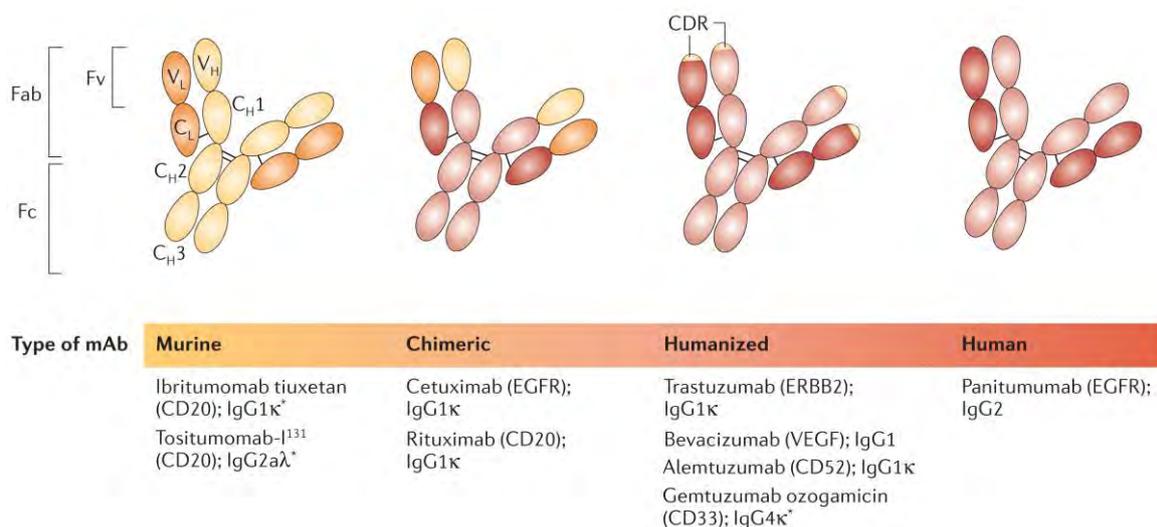


Figure 36 : Classification des différents types d'AcMo thérapeutiques selon l'origine de leurs parties variables et constantes. Extrait de ¹⁶.

Les AcMo font intervenir plusieurs mécanismes d'action qui vont permettre l'élimination de la cible. Ils peuvent posséder une cytotoxicité directe pour la cellule cancéreuse, *via* l'induction d'apoptose par exemple. Mais leur action repose essentiellement sur le déclenchement de mécanismes immunologiques comme l'ADCC, la CDC et la phagocytose dépendante des Ac (ADP)²⁵.

V-1-1-2- Les AcMo en clinique

Il existe actuellement 13 AcMo ayant une indication en oncologie approuvés par la FDA, et beaucoup d'autres sont en test dans des essais cliniques. La table 4 présente l'ensemble des AcMo et ADCs présents aujourd'hui sur le marché et leurs mécanismes d'action.

Antibody	Target	FDA-approved indication	Approval in Europe*	Mechanisms of action
Naked antibodies: solid malignancies				
Trastuzumab (Herceptin; Genentech): humanized IgG1	ERBB2	ERBB2-positive breast cancer, as a single agent or in combination with chemotherapy for adjuvant or palliative treatment ERBB2-positive gastric or gastro-oesophageal junction carcinoma as first-line treatment in combination with cisplatin and capecitabine or 5-fluorouracil	Similar	Inhibition of ERBB2 signalling and ADCC
Bevacizumab (Avastin; Genentech/Roche): humanized IgG1	VEGF	For first-line and second-line treatment of metastatic colon cancer, in conjunction with 5-fluorouracil-based chemotherapy; for first-line treatment of advanced NSCLC, in combination with carboplatin and paclitaxel, in patients who have not yet received chemotherapy; as a single agent in adult patients with glioblastoma whose tumour has progressed after initial treatment; and in conjunction with IFN α to treat metastatic kidney cancer	Similar	Inhibition of VEGF signalling
Cetuximab (Erbix; Bristol-Myers Squibb) [†] : chimeric human-murine IgG1	EGFR	In combination with radiation therapy for the initial treatment of locally or regionally advanced SCCHN; as a single agent for patients with SCCHN for whom prior platinum-based therapy has failed; and palliative treatment of pretreated metastatic EGFR-positive colorectal cancer	Similar	Inhibition of EGFR signalling and ADCC
Panitumumab (Vectibix; Amgen) [†] : human IgG2	EGFR	As a single agent for the treatment of pretreated EGFR-expressing, metastatic colorectal carcinoma	Similar	Inhibition of EGFR signalling
Ipilimumab (Yervoy; Bristol-Myers Squibb): IgG1	CTLA4	For the treatment of unresectable or metastatic melanoma	Similar	Inhibition of CTLA4 signalling
Naked antibodies: haematological malignancies				
Rituximab (Mabthera; Roche): chimeric human-murine IgG1	CD20	For the treatment of CD20-positive B cell NHL and CLL, and for maintenance therapy for untreated follicular CD20-positive NHL	Similar	ADCC, direct induction of apoptosis and CDC
Alemtuzumab (Campath; Genzyme): humanized IgG1	CD52	As a single agent for the treatment of B cell chronic lymphocytic leukaemia	Similar	Direct induction of apoptosis and CDC
Ofatumumab (Arzerra; Genmab): human IgG1	CD20	Treatment of patients with CLL refractory to fludarabine and alemtuzumab	Similar	ADCC and CDC
Conjugated antibodies: haematological malignancies				
Gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg; Wyeth): humanized IgG4	CD33	For the treatment of patients with CD33-positive acute myeloid leukaemia in first relapse who are 60 years of age or older and who are not considered candidates for other cytotoxic chemotherapy; withdrawn from use in June 2010	Not approved in the European Union	Delivery of toxic payload, calicheamicin toxin
Brentuximab vedotin (Adcetris; Seattle Genetics): chimeric IgG1	CD30	For the treatment of relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma and systemic anaplastic lymphoma	Not approved in the European Union	Delivery of toxic payload, auristatin toxin
⁹⁰ Y-labelled ibritumomab tiuxetan (Zevalin; IDEC Pharmaceuticals): murine IgG1	CD20	Treatment of relapsed or refractory, low-grade or follicular B cell NHL Previously untreated follicular NHL in patients who achieve a partial or complete response to first-line chemotherapy	Similar	Delivery of the radioisotope ⁹⁰ Y
¹³¹ I-labelled tositumomab (Bexxar; GlaxoSmithKline): murine IgG2	CD20	Treatment of patients with CD20 antigen-expressing relapsed or refractory, low-grade, follicular or transformed NHL	Granted orphan status drug in 2003 in the European Union	Delivery of the radioisotope ¹³¹ I, ADCC and direct induction of apoptosis

ADCC, antibody-dependent cellular cytotoxicity; CDC, complement-dependent cytotoxicity; CLL, chronic lymphocytic leukaemia; CTLA4, cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4; EGFR, epidermal growth factor receptor; FDA, US Food and Drug Administration; IgG, immunoglobulin G; IFN α , interferon- α ; NHL, non-Hodgkin's lymphoma; NSCLC, non-small-cell lung cancer; SCCHN, squamous cell carcinoma of the head and neck; VEGF, vascular endothelial growth factor.

*Based on information from the European Medicines Agency. [†]Not recommended for patients with colorectal cancer whose tumours express mutated KRAS.

Table 4 : AcMo actuellement approuvés par la FDA en oncologie et leurs mécanismes d'action. Extrait de ²⁵.

AcMo bloquant les « immune checkpoints »

Physiologiquement, les « immune checkpoints » – littéralement, les points de contrôle de l'immunité – constituent des mécanismes de protection contre la suractivation des lymphocytes T et donc contre le développement de maladies auto-immunes. Comme nous l'avons vu précédemment, ces mécanismes peuvent également être impliqués dans l'immuno-échappement des tumeurs au système immunitaire. C'est le cas notamment des processus immunosuppresseurs induits par CTLA-4 et le couple PD-1/PD-L1. Ainsi, des AcMo thérapeutiques ont été développés pour bloquer ces mécanismes dans le microenvironnement tumoral.

Deux AcMo anti-CTLA-4 ont été testés en essais cliniques, l'ipilimumab et le tremilimumab. Ces AcMo bloquent la transduction du signal de CTLA-4 et permettent donc de prolonger l'activation des lymphocytes T et de restaurer leur prolifération. Ainsi, la réponse immunitaire liée aux lymphocytes T est amplifiée et cela résulte en une réponse antitumorale globale plus efficace¹⁹⁵.

L'ipilimumab a donné des résultats prometteurs dans le traitement des mélanomes métastatiques. Son efficacité en monothérapie a été évaluée en comparaison de l'association ipilimumab/gp100 (vaccin peptidique expérimental) dans une étude randomisée en double aveugle incluant plus de 600 patients. Les résultats de cette étude ont montré que l'ipilimumab augmente la survie globale des patients, sans différence notable dans la médiane de survie entre les patients recevant l'ipilimumab en monothérapie et ceux recevant la combinaison gp100/ipilimumab. Les effets bénéfiques du traitement se sont montrés durables à long terme¹⁹⁶. Cette étude encourageante a conduit à l'approbation de cet AcMo par la FDA en 2011. Néanmoins, cette thérapie peut présenter des effets indésirables importants (\geq grade 3), liés à une activation augmentée ou excessive du système immunitaire. Ces effets indésirables peuvent être dose-limitants et les arrêts de traitement pour cause de toxicité excessive ont concernés près de 10% des patients¹⁹⁷.

Le tremilimumab a aussi montré des résultats prometteurs dans le traitement des mélanomes métastatiques. Cependant, même si les réponses observées étaient durables, l'essai

clinique de phase III a été stoppé pour cause de manque de résultats cliniques suffisamment probants¹⁹⁸.

Il existe aussi d'autres AcMo dirigés contre le mécanisme immuno-régulateur lié à PD-1/PD-L1. PD-1 est un récepteur de la famille de CD28 exprimé sur les lymphocytes T activés, les lymphocytes B et les monocytes. Il régule négativement l'activation antigénique et la prolifération des lymphocytes T et provoque leur anergie. Ses ligands spécifiques, PD-L1 et PD-L2, sont exprimés sur certaines cellules immunitaires et dans différents types de tissus non lymphoïdes et confèrent un effet protecteur contre les lymphocytes T auto-réactifs¹⁹⁹. PD-L1 peut également être exprimé sur les cellules tumorales dans de nombreux cancers²⁰⁰. Dans ce contexte, on comprend que le couple PD-1/PD-L1 constitue un mécanisme majeur de l'immuno-évasion des tumeurs. Il existe aujourd'hui 3 AcMo et une protéine de fusion ciblant PD-1 et 3 AcMo dirigé contre PD-L1. Le nivolumab, un AcMo anti-PD-1, a été testé en essai clinique de phase I et II dans différents types de cancers (mélanomes, carcinomes rénaux, cancers du poumon non à petites cellules...). Jusqu'ici, les résultats obtenus ont été positifs, avec des réponses significatives et durables (stabilisation de la maladie, régression des lésions tumorales)¹⁹⁸. Ces résultats ont été observés y compris dans des pathologies où les immunothérapies n'avaient pas rencontré un grand succès. De plus, il semble que le nivolumab entraîne moins d'effets indésirables sévères que d'autres immunothérapies comme IL-2 ou l'ipilimumab. Ceci pourrait être un avantage important pour une utilisation combinée avec d'autres agents thérapeutiques. Actuellement, ces études se poursuivent dans des essais cliniques de phase III²⁰¹. Un autre AcMo ciblant PD-1, le pembrolizumab, a été récemment approuvé par la FDA et est sous le coup d'une Autorisation Temporaire d'Utilisation (ATU) dans le traitement des mélanomes métastatiques en France²⁰².

Ces nouvelles stratégies de traitement, visant directement les mécanismes d'immuno-échappement tumoral, montrent des résultats prometteurs jusqu'ici et ouvrent de nouvelles perspectives intéressantes dans le traitement des cancers.

AcMo agonistes des molécules de costimulation

Une autre possibilité pour améliorer la réponse immunitaire spécifique antitumorale est de favoriser les signaux de costimulation nécessaires à la pleine activation des lymphocytes T.

Ainsi, plusieurs AcMo agonistes des molécules de costimulation des lymphocytes T comme CD40, OX40, CD137 ou encore CD27 sont en cours de développement. Certains de ces AcMo sont en test dans des essais cliniques de phase I¹⁹³. Cette approche avait déjà été envisagée il y a quelques années avec un AcMo superagoniste de CD28. Un essai clinique incluant six volontaires sains s'est déroulé pour tester cet AcMo mais il s'est soldé par un échec cuisant. En effet, une injection unique de l'AcMo chez les six volontaires a provoqué un « choc cytokinique », correspondant à un syndrome de libération massive de cytokines pro-inflammatoires, mettant les patients en danger de mort²⁰³. Cependant, les études pré-cliniques concernant la famille des récepteurs au TNF, comme CD27 ou CD137, semblent indiquer que ces molécules pourraient être de bonnes cibles thérapeutiques¹⁹³.

Antibody-drug conjugates et antibody-radioconjugates

Ces agents thérapeutiques sont des composés comprenant un AcMo couplé à un agent toxique ou un radio-élément. Ils ont été conçus sur l'idée que l'AcMo peut cibler spécifiquement les cellules tumorales et donc acheminer directement dans la tumeur le composé toxique qui lui est lié¹⁹⁴.

Il existe actuellement sur le marché deux spécialités de type ARC (Table 3). Toutes les deux sont indiquées dans le traitement du lymphome folliculaire. Lorsque l'AcMo se fixe à sa cible (CD20 pour les deux), le complexe ARC/cible est internalisé et le radioélément émet directement au sein de la cellule tumorale. Cependant, il faut rappeler que le CD20 est également exprimé sur les lymphocytes B sains. Donc, lors de son injection, le composé ARC va aussi éliminer les lymphocytes B sains et par la même occasion, exposer toutes les autres cellules hématopoïétiques à l'élément radioactif. Cet inconvénient peut être pallié en partie par des injections préalables d'AcMo non couplés au radioélément, qui vont saturer les lymphocytes B sains et permettre d'augmenter le taux de composés ARC au sein de la tumeur. La déplétion temporaire des lymphocytes B sains est rapidement récupérée par la suite. Actuellement, une dizaine d'agents thérapeutiques de ce type sont en cours d'essais cliniques²⁰⁴.

Le principe des ADC est le même que pour les ARC. L'AcMo va cibler spécifiquement la cellule tumorale et l'ADC sera internalisé. Suivant la nature du lien entre le composé toxique et l'AcMo, le composé actif sera libéré dans différents compartiments cellulaires. Cependant, le

lien qui relie le composé actif et l'AcMo doit être finement étudié, pour que le composé actif ne soit pas libéré prématurément mais qu'il soit tout de même relargué dans la tumeur. Jusqu'à récemment, deux spécialités pharmaceutiques de type ADC étaient approuvées par la FDA (Table 3). Mais le gemtuzumab ozagamicin a été retiré du marché pour manque d'efficacité²⁰⁴.

V-1-2- Le transfert adoptif de lymphocytes T cytotoxiques

Cette stratégie de traitement repose sur le transfert adoptif d'un grand nombre de lymphocytes T cytotoxiques sélectionnés pour leur forte affinité pour les Ags tumoraux. Ces lymphocytes peuvent être d'origine autologue ou allogénique. Par exemple, les TILs peuvent être extraits après résection tumorale et amplifiés *in vitro* avec de l'IL-2. Les lymphocytes T peuvent aussi être d'origine sanguine ou être génétiquement modifiés pour exprimer un TCR ciblant un Ag tumoral spécifique^{19,193}.

Ce type de traitement n'est pas utilisé en routine en oncologie. Et pour cause, il présente certaines limitations non négligeables : difficultés de développement *in vitro*, demi-vie très courtes des cellules ré-injectées chez le patient, coût... D'autant que ce type de thérapie correspond vraiment à des traitements au cas par cas du fait de la restriction HLA des lymphocytes T¹⁹³.

La demi-vie des cellules injectées peut être augmentée en réalisant des chimiothérapies de préparation pour induire une lympho-déplétion. Ceci présente un double avantage. D'une part, cela permet de diminuer le taux de cellules immunosuppressives dans le microenvironnement de la tumeur (Tregs en particulier). D'autre part, la prise de greffe après le transfert adoptif est plus efficace car il y a plus d'espace dans les organes lymphoïdes secondaires¹⁹.

Ces techniques ont été améliorées avec l'aide des vecteurs lentiviraux et rétroviraux. La figure 37 illustre trois stratégies d'immunothérapies impliquant des lymphocytes T transgéniques. Par exemple, dans le cas des lymphocytes T hétérologues, il est possible de collecter un clone réactif contre une tumeur chez un patient et de le modifier pour qu'il devienne HLA-compatible pour un autre patient¹⁹³. A titre d'exemple, nous pouvons citer l'étude réalisée par Johnson et *al.* et qui avait pour but de tester une thérapie par ACT pour traiter des patients

atteints de mélanomes métastatiques. Pour obtenir des TCR hautement réactifs contre les Ags de mélanomes, ils ont réalisé un criblage de lymphocytes T (TCR humains) et ont également immunisé des souris avec des Ags tumoraux de mélanome (TCR murins). Les gènes codant ces TCRs ont été inclus dans des vecteurs rétroviraux puis introduits dans des lymphocytes T périphériques autologues de 36 patients avant transfert adoptif. Au final, des réponses cliniques objectives (régressions des lésions) ont été observées chez 30% des patients qui ont reçu des lymphocytes T avec TCR humains et 19% des patients qui ont eu les lymphocytes T avec TCR murins. Cependant, les thérapies ont aussi provoqué des effets indésirables de type auto-immunitaires (uvéites, destruction des mélanocytes normaux dans la peau, l'œil et l'oreille)²⁰⁵.

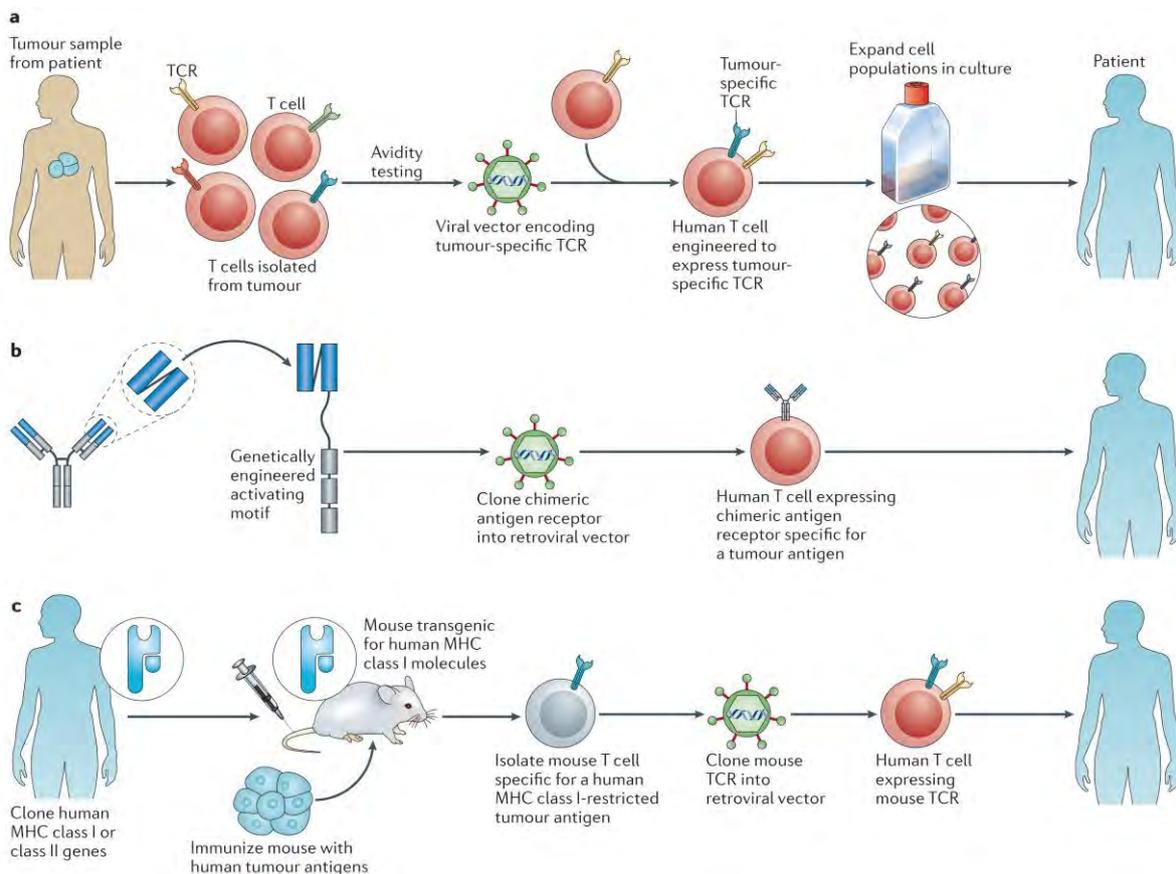


Figure 37 : Méthodes pour modifier génétiquement les lymphocytes T afin de leur conférer une spécificité contre des Ags associés aux tumeurs. Extrait de ¹⁹.

V-2- Immunothérapies actives

L'immunothérapie active correspond à l'immunisation du patient avec un Ag de tumeur et à l'activation de la réponse antitumorale spécifique qui en résulte. Ce procédé nécessite donc

d'identifier des Ags tumoraux et implique les CPA, les DCs en particulier, les lymphocytes T CD4 et les CTLs¹⁹³.

On peut distinguer deux types d'Ag tumoraux utilisés dans ces procédés, les TSA (tumor-specific antigens) et les TAA (tumor-associated antigens). Les TSA sont des Ags exprimés spécifiquement par les tumeurs. Ils ont l'avantage d'éliciter une réponse immune puissante et très spécifique contre les cellules tumorales²⁰⁶. Cependant, ce type d'Ag est rarement trouvé sur les tumeurs, ce qui constitue un facteur limitant dans le développement de vaccins ciblant de tels Ags. En outre, ce type de vaccin peut exercer une forte pression de sélection sur la tumeur conduisant à l'émergence de clones tumoraux résistants à la thérapie. Les TAA sont des Ags issus d'une protéine mutée, la protéine normale étant exprimée sur les tissus sains. C'est le cas notamment du CEA dans le cancer de la prostate ou de la protéine HER2/neu dans le cancer du sein et les cancers gastro-oesophagiens²⁰⁷. Ces Ags sont plus courants donc la création d'un vaccin les ciblant est plus aisée. Par contre, ils génèrent une réponse immune moins forte et la vaccination avec ces Ags peut engendrer des effets indésirables liés à l'auto-immunité²⁰⁶.

Il existe deux types de vaccins en oncologie : les vaccins à visée prophylactique et les vaccins thérapeutiques. Parmi les vaccins prophylactiques, le plus connu aujourd'hui est le Gardasil®, qui protège contre quatre sérotypes de HPV (6, 11, 16 et 18) et qui est indiqué dans la prévention de certains cancers gynécologiques et anaux²⁰⁸. En ce qui concerne les vaccins thérapeutiques, un seul à ce jour a été approuvé par la FDA pour son utilisation en clinique. Il s'agit du sipuleucel-T (Provenge®) indiqué dans le traitement du cancer de la prostate. Ce vaccin est conçu pour obtenir une réponse immune dirigée contre l'Ag PAP (prostate acid phosphatase) exprimé par les cellules cancéreuses de la prostate. Pour cela, des PBMCs autologues sont incubées avec la protéine de fusion PA2024, combinant l'Ag PAP recombinant et du GM-CSF recombinant. L'activation des APCs dans les PBMCs est assurée par du GM-CSF additionnel. Ainsi, les APCs « chargées » en Ag PAP vont activer et induire l'expansion clonale des lymphocytes T spécifiques de cet Ag. Après moins de trois jours d'incubation, les cellules cytotoxiques peuvent être ré-injectées chez le patient. Cette méthode a montré des résultats intéressants avec une augmentation de la médiane de survie globale de 4,1 mois (survie à 36 mois : 31,7% dans le groupe traité par sipuleucel-T contre 23% dans le groupe recevant le

placebo)²⁰⁹. Jusqu'ici, ce type de méthode utilisant l'activation *ex vivo* des DCs avec un Ag spécifique a donné les résultats les plus prometteurs²¹⁰.

V-3- L'immunomodulation

L'activation ou l'inhibition des cellules du système immunitaire sont régulées par un ensemble de récepteurs et de facteurs solubles très divers. Tous ces éléments peuvent représenter des cibles thérapeutiques potentielles en oncologie. Nous avons déjà évoqué les stratégies impliquant le ciblage des « immune checkpoints » et des molécules de costimulation activatrices. Il est également possible de stimuler les réponses immunitaires de type Th1 en injectant des cytokines recombinantes. En effet, ces dernières sont souvent essentielles dans l'initiation ou le maintien d'une réponse immune efficace. En immunothérapie anticancéreuse, elles permettent d'amplifier la réponse immune cytotoxique en agissant sur les DCs, les lymphocytes T et les cellules NK. La limitation principale de leur utilisation résulte de leurs effets pléiotropiques qui sont source de nombreux effets indésirables²¹¹. Trois cytokines essentielles dans les réponses immunitaires ont beaucoup été étudiées en oncologie : l'IFN- α , l'IL-2 et le GM-CSF.

L'interféron- α

C'est la cytokine qui est utilisée depuis le plus longtemps en immunothérapie anticancéreuse. Son potentiel thérapeutique a été évalué dans plusieurs types de cancers solides et d'hémopathies malignes. Bien que ses indications soient plus restreintes aujourd'hui, l'IFN- α reste encore largement utilisé dans le traitement de certains cancers, comme les mélanomes métastatiques par exemple²¹². Cette cytokine exerce deux types d'action sur les tumeurs. D'une part, comme les IFN de type II, elle agit directement sur les cellules cancéreuses en bloquant leur prolifération. D'autre part, elle joue un rôle activateur important dans les réponses immunes antitumorales. Pourtant négligé pendant longtemps, cet aspect de la bioactivité de l'IFN- α semble néanmoins plus important que l'effet cytostatique pour la réponse antitumorale²¹³. L'IFN- α possède un large spectre d'action. En effet, il participe à la différenciation des monocytes sanguins en DCs et à leur activation, en augmentant l'expression des molécules du CMH de classe I à leur surface. De plus, l'IFN- α promeut d'une manière générale les réponses immunitaires de

type Th1, notamment *via* son activité sur les CTLs²¹⁴. Ainsi, il a été montré que l'IFN- α participe *in vivo* à l'amplification et la survie à long-terme des CTLs en réponse à un Ag spécifique²¹⁵. En immunothérapie, l'IFN- α a aussi été testé en combinaison avec des vaccins peptidiques dans le traitement du mélanome métastatique. Son utilisation a été corrélée avec une augmentation importante des CTLs sanguins spécifiques des Ags du vaccin²¹⁶. Ces études démontrent l'intérêt de cette cytokine comme adjuvant en immunothérapie anticancéreuse. En revanche, les traitements incluant l'IFN- α s'accompagnent quasi-systématiquement de manifestations auto-immunes telles que thyroïdites, diabète de type I, hépatites ou encore vascularites²¹².

L'interleukine-2

L'IL-2 est le facteur de croissance le plus important des lymphocytes T et des cellules NK. L'amplification de ces cellules par l'IL-2 peut être induite tant *in vitro* qu'*in vivo*. De plus, l'IL-2 soutient aussi leur maturation et leurs fonctions effectrices. Il est donc tout à fait logique que cette cytokine soit utilisée depuis longtemps en immunothérapie anticancéreuse²¹⁷.

Son potentiel thérapeutique est réellement connu depuis les années 1980. En effet, dans une étude publiée en 1985, 25 patients atteints de tumeurs solides métastatiques, en échec thérapeutique avec d'autres traitements, ont été traités avec des doses croissantes d'IL-2 toutes les 8 heures. Ceci permettait de maintenir une concentration sérique efficace pour induire la réponse immunitaire antitumorale. Les doses s'échelonnaient de 60 000 IU/kg à 600 000 IU/kg. Parmi les 25 patients, 4/7 atteints de mélanomes métastatiques et 3/3 atteints de carcinomes rénaux ont montré des régressions tumorales partielles ou complètes. Certains de ces patients ont même été complètement guéris. Ce fut la première fois qu'une manipulation sur le système immunitaire dans un but thérapeutique permettait d'obtenir de tels résultats²¹⁸.

D'autres études cliniques ont suivi et ont montré des résultats encourageants. Ces études ont conduit la FDA à approuver l'usage thérapeutique de l'IL-2 recombinante dans le traitement des carcinomes rénaux métastatiques en 1992 et dans les mélanomes métastatiques en 1998²¹⁷.

Cependant, l'usage de l'IL-2 dans les thérapies reste limité en raison de sa forte toxicité intrinsèque, provoquant notamment fièvre, frissons, malaise et altérations des fonctions hépatiques. Ces symptômes restent généralement sous contrôle avec les traitements adaptés.

Ce qui pose plus de problèmes aux cliniciens est le syndrome de fuite capillaire engendré par cette cytokine. Ce syndrome se traduit par une oligurie, des œdèmes généralisés, des arythmies cardiaques et des hypotensions. Si le phénomène n'est pas contrôlé, des défaillances multi-organiques peuvent se produire, pouvant aller jusqu'à la mort du patient^{217,219}. Cette forte toxicité a obligé les cliniciens à envisager des traitements avec des doses d'IL-2 plus faibles, mais les résultats des essais cliniques ont clairement démontré le bénéfice de fortes doses d'IL-2 par rapport aux faibles doses. Ainsi, l'apparition de thérapies ciblées comme l'ipilimumab remet quelque peu en question son utilisation²¹⁹.

Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor

Le GM-CSF est un facteur de croissance des lignages myéloïdes ayant un large spectre d'action sur le système immunitaire. Une de ses propriétés particulièrement intéressante en oncologie est sa capacité à induire la différenciation et la maturation des monocytes en DCs. Ainsi, cette cytokine peut promouvoir l'ensemble de la réponse immunitaire antitumorale puisqu'elle va indirectement augmenter les populations de CTLs *via* son action sur les DCs²²⁰.

Plusieurs études, notamment sur des patients atteints de mélanomes métastatiques, ont évalué le potentiel thérapeutique du GM-CSF en oncologie, dans différentes stratégies de traitement. Certains de ces tests n'ont pas donné de résultats concluants. Dans les études cliniques où le GM-CSF était utilisé comme traitement adjuvant après résection tumorale, les résultats étaient inconstants et décevants. Il en a été de même pour les tests où le GM-CSF était associé à des chimiothérapies ou utilisé comme adjuvant dans les vaccins thérapeutiques²²⁰. Pourtant, concernant cette dernière application, rappelons que le seul vaccin thérapeutique approuvé en oncologie est le sipuleucel-T, qui inclut des injections de GM-CSF recombinant.

En revanche, l'usage du GM-CSF semble prometteur dans les traitements basés sur des virus oncolytiques. Par exemple, le T-VEC ou Oncovex^{GM-CSF} est un agent thérapeutique dérivé de l'*Herpes simplex virus-1* (HSV-1). C'est un virus oncolytique atténué et modifié génétiquement pour produire du GM-CSF humain au sein de la tumeur. Dans une étude de phase 2 menée sur des patients atteints de mélanomes de grade III ou IV non résécables incluant 50 patients, 8 ont eu une rémission complète et 5 une réponse partielle. La survie globale à un an était de 58%.

Chez les patients répondeurs, un important infiltrat lymphocytaire a été observé dans les lésions ainsi qu'une diminution du taux de cellules régulatrices²²¹.

Toujours dans le traitement du mélanome, le GM-CSF a également montré de bons résultats en combinaison avec l'ipilimumab. En effet, Hodi et ses collaborateurs ont présenté en 2013 les résultats d'une étude randomisée multicentrique de phase II. Cette étude a montré que l'association du GM-CSF avec l'ipilimumab permettait d'augmenter la survie globale des patients par rapport à l'ipilimumab seul, sans augmentation de la toxicité du traitement. Il semblerait même que le GM-CSF induise une meilleure tolérance au traitement²²². Ainsi, ces deux dernières études montrent que le GM-CSF possède un potentiel intéressant pour les immunothérapies du cancer, notamment dans les traitements des mélanomes métastatiques.

D'autres cytokines ayant des effets immuno-modulateurs importants, comme l'IL-12, ont déjà été testées en clinique, ou sont en passe de l'être²²³. Les recherches dans ce domaine pourraient donc amener des développements cliniques intéressants dans les années à venir.

V-4- Les lymphocytes T Vy9Vδ2 en immunothérapie anticancéreuse

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont de bons candidats pour les immunothérapies anticancéreuses du fait de leur activation antigénique non restreinte aux molécules du CMH, de leur amplification rapide et de leur potentiel cytotoxique envers de nombreux types de cellules cancéreuses. De plus, les lymphocytes T $\gamma\delta$ font partie des TILs présents dans le microenvironnement de certaines tumeurs, suggérant leur implication naturelle dans l'immunité antitumorale^{96,118,224,225}.

Chez l'Homme, les deux sous-populations majoritaires de lymphocytes T $\gamma\delta$, les Vδ1 et Vδ2, ont fait l'objet d'études concernant leur potentiel antitumoral. Les lymphocytes T Vδ1 ont montré une forte activité cytotoxique contre les cellules cancéreuses dans les leucémies lymphoïdes et myéloïdes aiguës, les leucémies lymphoïdes chroniques et les myélomes multiples primaires²²⁶⁻²²⁸. Certaines études montrent que l'on peut induire une forte expansion *ex vivo* de lymphocytes T Vδ1 (et Vδ2) à partir de PBMCs en utilisant des molécules d'activation non spécifiques^{227,229,230}. Cependant, l'absence d'Ags connus pouvant spécifiquement activer leur TCR reste une limitation importante dans le développement de thérapies à base de lymphocytes T Vδ1. Les études pré-cliniques et les essais cliniques portant sur les lymphocytes T $\gamma\delta$ se sont

donc concentrés pour la plupart sur les lymphocytes T V γ 9V δ 2. En effet, le développement de PAg synthétiques comme le BrHPP ou l'utilisation déjà validée des ABPs en clinique simplifient la mise en œuvre de telles thérapies.

Plusieurs études pré-cliniques ont démontré la faisabilité d'immunothérapies anticancéreuses avec des lymphocytes T V γ 9V δ 2. La souris ne possédant pas cette sous-population de lymphocytes T $\gamma\delta$, le modèle pré-clinique de choix chez le rongeur est l'utilisation de souris immunodéprimées SCID (Severe Combined Immunodeficiency) xéno greffées avec des tumeurs humaines. Kabelitz et ses collaborateurs ont utilisé de telles souris avec des xéno greffes de mélanomes ou d'adénocarcinomes pancréatiques humains. Puis, ils ont réalisé un transfert adoptif de lymphocytes T V γ 9V δ 2 humains amplifiés avec un PAg ou un ABP couplé à de l'IL-2. Ces lymphocytes T $\gamma\delta$ sont cytotoxiques *in vitro* envers les cellules cancéreuses et sécrètent de l'IFN- γ et du TNF- α . Les injections répétées de lymphocytes T V γ 9V δ 2 couplées à des injections d'alendronate et d'IL-2 permettent de tripler le temps de survie moyen des souris porteuses de mélanomes et de doubler celui des souris porteuses d'adénomes pancréatiques²³¹. D'autre part, des études ont été réalisées sur des macaques *Cynomolgus*, qui portent les mêmes lymphocytes T V γ 9V δ 2 que l'homme. Dans ces modèles, les chercheurs ont évalué l'amplification *in vivo* des lymphocytes T V γ 9V δ 2 avec injection directe en intraveineuse de PAg (BrHPP) ou d'ABP couplé à de l'IL-2 à faibles doses^{123,232}. L'administration à fortes doses de BrHPP ne provoque pas de toxicité chez les singes mais n'induit pas de prolifération des T $\gamma\delta$. De plus, des injections répétées de PAg diminuent la réponse proliférative suggérant une anergie des lymphocytes T $\gamma\delta$ ¹²³. La costimulation avec l'IL-2 engendre une amplification transitoire mais très importante des lymphocytes T V γ 9V δ 2. Après amplification, ils ont un phénotype T_{CM} et T_{EM} et sécrètent de l'IFN- γ et du TNF- α ^{123,232}. De plus, les études menées chez la souris et le macaque *Cynomolgus* portant sur les capacités d'ADCC des lymphocytes T $\gamma\delta$ montrent aussi le potentiel thérapeutique de ces cellules^{225,233,234}.

Les lymphocytes T V γ 9V δ 2 expriment le récepteur CD16A^{49,235}. Plusieurs études montrent le potentiel d'ADCC *in vitro* de ces lymphocytes activés par des PAg ou du zoledronate en combinaison avec le TTZ, l'alemtuzumab ou différents AcMo ciblant les lymphocytes B (RTX, GA101, ofatumumab)^{234,236,237}. Ces résultats ont été confirmés *in vivo* dans des modèles de souris immunodéprimées^{225,233} et des macaques *Cynomolgus*²³⁴ mais aussi *ex vivo* avec des

patients atteints d'hémopathies malignes, de cancers du sein ou de cancers pancréatiques^{225,233,236,238}. Les lymphocytes T V γ 9V δ 2 expriment CD137L, ligand de la molécule de costimulation CD137 exprimée par les cellules NK. Cette interaction augmente l'activation des cellules NK et renforce leur potentiel cytotoxique, ce qui augmente encore plus le phénomène d'ADCC^{239,240} (Figure 38).

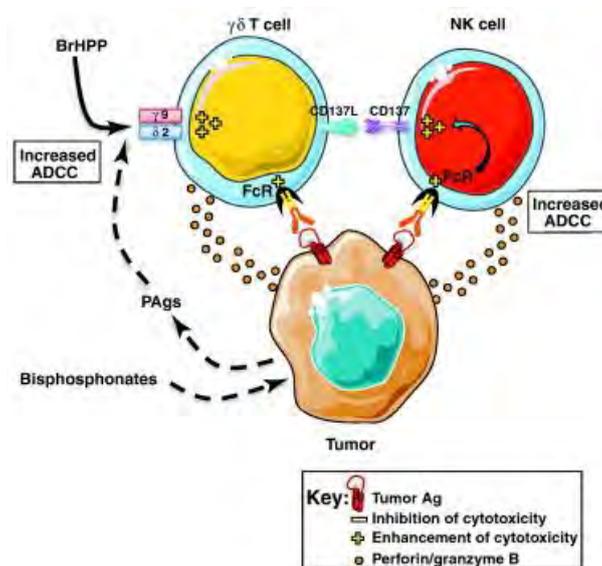


Figure 38 : Mécanismes d'ADCC des lymphocytes T V γ 9V δ 2 et des cellules NK. Extrait de ²⁶.

Augmenter l'ADCC des lymphocytes T γ δ ou des cellules NK est une stratégie intéressante pour lutter contre les cellules cancéreuses naturellement résistantes à l'activité cytotoxique de ces effecteurs. Pour cela, Oberg et ses collaborateurs ont conçu des Ac bi-spécifiques anti-CD3/anti-HER2 ou anti-V γ 9/anti-HER2 permettant d'activer les lymphocytes T γ δ tout en ciblant les cellules pancréatiques exprimant HER2/neu. Ces deux Ac potentialisent l'activité d'ADCC des lymphocytes T γ δ en augmentant leur sécrétion de granzyme et de perforine. Ainsi, ils observent une réduction de la croissance tumorale dans des souris immunodéficientes xéno greffées avec des tumeurs pancréatiques après transfert adoptif de lymphocytes T V γ 9V δ 2 et de l'Ac anti-V γ 9/HER2²³³.

Ces études pré-cliniques ont ouvert la voie vers l'élaboration de protocoles d'immunothérapies anticancéreuses chez l'Homme et depuis 2003, plusieurs essais cliniques de phase I et II ont vu le jour. Différentes stratégies sont possibles, celles basées sur le transfert

adoptif de lymphocytes T $\gamma\delta$ autologues amplifiés *ex vivo* à l'aide d'une combinaison de PAg ou d'ABP et d'IL-2, ou celles basées sur l'amplification directe *in vivo* des lymphocytes T $\gamma\delta$ en utilisant des cycles de traitement combinant PAg ou ABP et IL-2 (Figure 39).

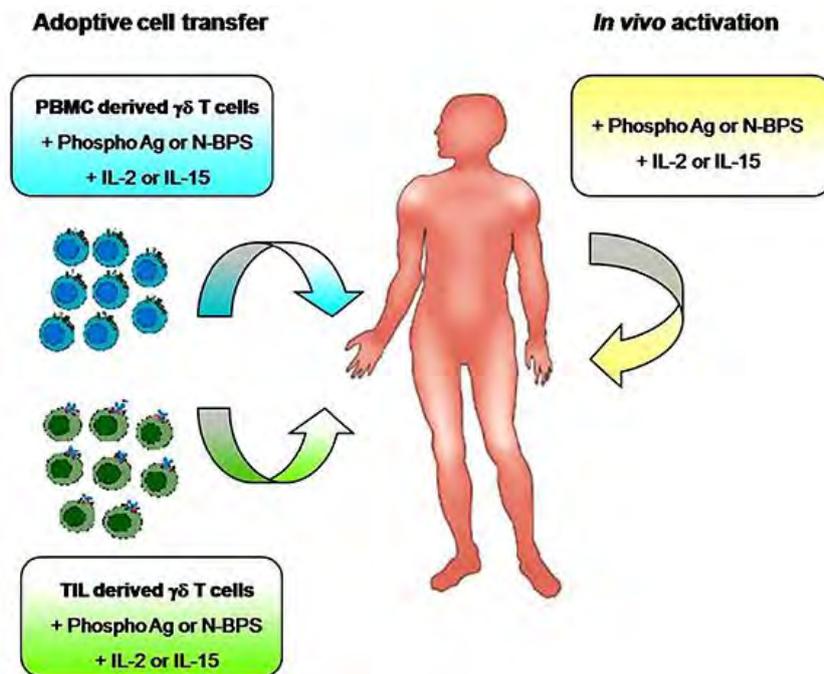


Figure 39 : Les stratégies d'immunothérapies antitumorales basées sur les lymphocytes T $\gamma\delta$. N-BP : aminobiphosphonates. Extrait de ²⁸.

L'efficacité des thérapies à base de transfert adoptif de cellules a été estimée au cours de plusieurs études incluant des patients avec des cancers solides variés²⁴¹⁻²⁴⁴ et des myélomes multiples²⁴⁵. Dans ces essais cliniques, les lymphocytes T $\gamma\delta$ étaient amplifiés *ex vivo* à partir de PBMCs autologues avec une combinaison de PAg ou ABP et IL-2. Leur caractérisation phénotypique avant ré-injection montre que la plupart des lymphocytes T $\gamma\delta$ amplifiés sont des T_{CM} ou des T_{EM}. Dans la majorité des cas, le traitement comprenant plusieurs cycles d'injections cellulaires plus ou moins couplées à des injections d'IL-2 a été bien toléré. Des résultats cliniques encourageants ont pu être observés dans certains cas : stabilisation de la progression clinique, ralentissement ou diminution de la progression tumorale, diminution des marqueurs biologiques tumoraux... Un cas de rémission complète a même été observé chez un patient atteint d'un carcinome rénal avec métastases pulmonaires²⁴⁶. L'utilisation de lymphocytes T $\gamma\delta$ marqués par un radioélément a permis de déterminer les sites privilégiés

dans lesquels s'établissent les lymphocytes $T\gamma\delta$: les poumons, le foie, la rate et dans certains cas des sites métastatiques différents de ces organes²⁴⁷. Izumi et ses collaborateurs ont réalisé un essai clinique avec transfert adoptif de lymphocytes $T\gamma\delta$ sans injection additionnelle d'IL-2 chez les patients atteints de cancers colorectaux. Dans cette étude, le nombre absolu de lymphocytes $T\gamma\delta$ se maintenait après l'arrêt des injections de cellules, même en absence d'IL-2. Les auteurs ont donc suggéré la possible implication d'un facteur endogène tel que l'IL-2 ou l'IL-15 pour le maintien de cette population cellulaire²⁴⁸.

Plusieurs groupes ont aussi testé la toxicité et l'efficacité de la combinaison ABP/IL-2 sur l'amplification *in vivo* des lymphocytes T $V\gamma9V\delta2$. Ces études incluaient des patients atteints d'hémopathies malignes²⁴⁹, de carcinomes rénaux²⁵⁰, de cancers du sein ou de la prostate métastatiques^{242,251,252}. Globalement, en raison d'une adaptation rigoureuse des doses d'IL-2 injectées, le traitement a été bien toléré par l'ensemble des sujets. Ces études ont mis en évidence plusieurs points importants. D'une part, bien que les ABPs seuls parviennent à activer les T $V\gamma9V\delta2$, l'amplification *in vivo* est strictement dépendante de l'IL-2^{242,251}. D'autre part, dans l'étude menée par Lang et ses collaborateurs, l'administration répétée de zoledronate et d'IL-2 a conduit à une diminution du pourcentage des lymphocytes $T\gamma\delta$ au cours des cycles de traitement²⁵⁰, en adéquation avec les résultats observés chez les singes traités plusieurs fois par PAg¹²³. Enfin, dans la majorité des cas, les patients n'ayant pas d'amplification des lymphocytes $T\gamma\delta$ après traitement ont eu une progression de leur maladie tandis que les patients répondant au traitement ont eu des progressions cliniques stabilisées, voire des rémissions partielles, avec une augmentation du temps de survie. Dans ces cas là, l'évolution favorable de la maladie est corrélée avec l'augmentation des lymphocytes $T\gamma\delta$ dans le sang.

La bonne tolérance des PAg synthétiques tel que le BrHPP ayant déjà été testée en étude pré-clinique¹²³, son efficacité et sa toxicité en combinaison avec de faibles doses d'IL-2 ont également été évaluées *in vivo* sur un panel de 28 patients porteurs de différentes tumeurs solides incluant entre autres des carcinomes rénaux, des cancers colorectaux, des cancers du sein avec des métastases pulmonaires ou osseuses. Dans cette étude, la combinaison BrHPP/IL-2 a été bien tolérée par les patients, avec des effets indésirables dose-limitants uniquement à fortes doses de BrHPP. La majorité des patients ont eu une augmentation BrHPP dose-

dépendante des lymphocytes T V γ 9V δ 2 dans le sang et selon les critères d'évaluation de réponse au traitement RECIST, 12 maladies stables et 16 maladies progressives ont été observées²⁵³.

Bien que ces résultats soient encourageants, un certain nombre de points restent limitants pour l'utilisation de ces thérapies²⁵⁴. Un grand nombre de patients inclus dans ces études ne répondent pas aux traitements, quelque que soit la stratégie utilisée. Plusieurs raisons peuvent être évoquées. De nombreux mécanismes, décrits dans la suite de cet exposé, participent à l'immuno-échappement tumoral et peuvent empêcher l'efficacité de la thérapie²⁵⁵. Un exemple d'étude illustre ces mécanismes. Kunzmann et ses collaborateurs ont mené un essai clinique de phase I/II avec des patients atteints de carcinomes rénaux, de mélanomes malins et de leucémies aiguës myéloïdes où les lymphocytes T γ δ étaient ciblés directement *in vivo* par injection de zoledronate et d'IL-2. Chez ces patients, ils ont pu observer une amplification des lymphocytes T γ δ produisant de l'IFN- γ . Pourtant, aucune réponse clinique objective n'a été observée chez les patients atteints de tumeurs solides. De plus, le taux sérique de VEGF augmentait et était corrélé avec l'absence de réponse clinique²⁵⁶.

D'autre part, nous avons vu que la stimulation directe *in vivo* par injections répétées de PAg ou d'ABP peut parfois conduire à une anergie des lymphocytes T γ δ , avec une récupération des capacités prolifératives très longue²⁸. Il faut aussi noter que la nécessité absolue d'IL-2 exogène reste un problème majeur dans l'utilisation de ce type de thérapie. Dans les stratégies basées sur un transfert adoptif, les cellules sont amplifiées *ex vivo* avec de l'IL-2 et PAg ou ABP. L'IL-2 induit l'expression de FasL sur les cellules activées, ce qui en retour induit l'AICD des cellules²⁵⁷. Mais c'est surtout l'utilisation d'IL-2 *in vivo* qui pose problème. En effet, nous avons déjà évoqué la toxicité intrinsèque très importante de cette cytokine²¹⁹. Celle-ci peut conduire à l'utilisation de doses maximales tolérées qui s'avèrent sub-optimales et donc être source d'échecs thérapeutiques^{219,258}.

Plusieurs pistes existent pour améliorer l'efficacité thérapeutique de ces protocoles. Ces thérapies pourraient être couplées à l'utilisation d'AcMo tel que le RTX dans les hémopathies malignes puisque cette combinaison a déjà démontré son efficacité dans les modèles précliniques. La toxicité des lymphocytes T γ δ pourrait également être améliorée en jouant sur

l'activation induite par les ligands de NKG2D²⁵⁸. Enfin, il est essentiel d'identifier de nouveaux facteurs de croissance pouvant remplacer l'IL-2 dans ces thérapies.

L'IL-33, présentée précédemment et dont la signalisation est γ_c -indépendante, pourrait être une molécule candidate pour remplacer l'IL-2 dans ces immunothérapies anticancéreuses.

**DEMARCHE SCIENTIFIQUE
ET OBJECTIFS DES
TRAVAUX DE RECHERCHE**

Les immunothérapies anticancéreuses par les lymphocytes T V γ 9V δ 2 représentent une stratégie thérapeutique prometteuse dans le traitement de certains cancers. En effet, le fait que certaines cellules cancéreuses aient une expression dérégulée de PAg ajouté au fait que les lymphocytes T V γ 9V δ 2 reconnaissent ces PAg dans un contexte de non restriction par les molécules du CMH explique l'intérêt suscité par ces cellules par rapport aux autres cellules immunitaires cytotoxiques pour les immunothérapies anticancéreuses. Cependant, leur utilisation reste limitée. Comme les lymphocytes T V γ 9V δ 2 constituent une population minoritaire dans le sang, l'efficacité des traitements repose sur leur expansion préalable, notamment réalisée à l'aide d'IL-2. L'utilisation combinée de l'IL-2 avec un PAg tel que le BrHPP ou du zolédronate a montré son efficacité dans plusieurs essais cliniques. Cependant, l'IL-2 possède une forte toxicité intrinsèque, qui impose d'utiliser des doses sub-optimales pouvant être source d'échecs thérapeutiques²⁵⁴. Tous les récepteurs des cytokines de la famille de l'IL-2 ont en commun la chaîne gamma (γ_c) et les voies de signalisation en aval de cette chaîne sont responsables de cette toxicité. Il est donc important d'identifier de nouvelles molécules pouvant induire l'amplification des lymphocytes T V γ 9V δ 2, dont la transduction du signal soit γ_c -indépendante.

L'IL-33, dont le récepteur ne recrute pas cette chaîne γ lors de la signalisation, pourrait être une de ces molécules. C'est une alarmine naturellement présente dans le microenvironnement de certaines tumeurs²⁶¹. Elle possède un large spectre d'action sur les cellules du système immunitaire, étant capable d'induire ou d'amplifier des réponses immunitaires de type Th1 ou Th2 selon le contexte inflammatoire^{20,373}. Cette cytokine pluripotente a montré un intérêt thérapeutique dans de nouvelles stratégies de traitement des cancers^{360,404}. Néanmoins, sa bioactivité sur les lymphocytes T V γ 9V δ 2 n'avait encore jamais été étudiée.

L'objectif de mes travaux de recherche au cours de mon doctorat était de déterminer si l'IL-33 peut potentialiser les fonctions anticancéreuses des lymphocytes T V γ 9V δ 2, dans le but d'évaluer son intérêt thérapeutique en immunothérapie anticancéreuse. Au cours de cette étude, nous avons démontré que l'IL-33 potentialise la prolifération et l'amplification des lymphocytes T V γ 9V δ 2 activés par un PAg, le BrHPP. Cette découverte a fait l'objet d'un dépôt de brevet (Duault et *al.*, 2012, EP12306385) et nous a amené à étudier tant l'impact de

l'IL-33 sur les fonctions antitumorales des lymphocytes T V γ 9V δ 2 que le mécanisme de cette prolifération. Cette étude a été réalisée en collaboration avec l'équipe de Jean-Philippe Girard (IPBS, Toulouse, France), qui nous a fourni l'IL-33 pour ces travaux.

L'article qui suit, actuellement en cours de soumission, synthétise les résultats obtenus au cours de mes travaux de doctorat sur ce projet.

RESULTATS

IL-33 promotes V γ 9⁺ T cells amplification *via*
a CD4 T cell interaction-dependent mechanism

Caroline Duault^{1,2,3}, Julien Familiades⁴, Corinne Cayrol⁵, Stéphane Roga⁵, Jean-Philippe Girard⁵, Jean-Jacques Fournié^{1,2,3} and Mary Poupot^{1,2,3*}

¹ INSERM UMR1037, Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse, Toulouse, France

² Université Toulouse III Paul-Sabatier, Toulouse, France

³ ERL 5294 CNRS, Toulouse, France

⁴ INSERM U1043-Centre de Physiopathologie Toulouse Purpan, Toulouse, France

⁵ CNRS UMR 5089, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Toulouse, France

*Correspondence address: mary.poupot@inserm.fr phone: +335 6274 1661

Running title: IL-33 and human peripheral blood $\gamma\delta$ T cells

Keywords: Interleukin-33, gamma delta T cells, CD4 T cells, immunotherapy, Interleukin-2, Cancer

Grant support: This work was supported in part by institutional grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Université de Toulouse 3 and by contracts from RITC and Fondation Arc pour la Recherche contre le Cancer (ARC).

Counts:

Abstract

Human V γ 9⁺ T cells are unconventional lymphocytes activated by non-peptide antigens, the phosphoantigens as BrHPP. These HLA-unrestricted cells recognize a wide array of tumor cells to which they respond by secreting pro-inflammatory cytokines and cell-mediated cytotoxicity. Their efficacy in cancer immunotherapy is demonstrated but appears strongly limited by the toxicity of IL-2 which is essential for their expansion. In order to substitute this toxic γ -chain dependent cytokine, we evaluated the efficiency of IL-33, a γ -chain independent cytokine, on the expansion of V γ 9⁺ T cells. The IL-1 family member IL-33 is an alarmin constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells in the tumor microenvironment. This cytokine is a well-known inducer of Th2 type cells but it also displays a great potential for sustaining Th1-polarized immune responses.

We showed in this study that IL-33 enhances the proliferation and amplification of BrHPP-activated V γ 9⁺ T cells. Moreover, IL-33-induced V γ 9⁺ T cells display Th1-type cytokine expression, especially TNF- α , and cytolytic activity against tumor cells. Furthermore, we highlighted an original mechanism for the IL-33-induced proliferation of V γ 9⁺ T cells which is an indirect mechanism exclusively depending on a contact of V γ 9⁺ T cells with CD4 T cells.

Altogether, these results suggest that IL-33 represents an alternative to IL-2 in V γ 9⁺ T cell-based immunotherapies.

Introduction

Human $\gamma\delta$ T cells comprise several subsets of cells defined by their T-cell receptor (TCR). Cells expressing the $V\gamma 9^+$ TCR are the most prominent in peripheral blood and represent 1 to 3% of mononuclear cells. These cells are considered as unconventional T lymphocytes due to their TCR recognizes non peptidic small molecules called phosphoantigens (PAgs). These phosphorylated metabolites are produced by the cholesterol pathway in microbial pathogens¹ and tumors cells². Their MHC-unrestricted cytotoxic activity against malignant cells has raised expectations for their use in therapeutic applications for cancer. *In vitro*, PAg-stimulated $V\gamma 9^+$ T cells proliferate, secrete pro-inflammatory cytokines and chemokines, and exert a potent cytotoxic activity against a broad spectrum of hematopoietic or solid malignancies^{3,4}. Their ability to interact with cancer cells explains that tumor-infiltrating $V\gamma 9^+$ T cells were detected in numerous types of malignancies^{5,6}. In addition, because various selective agonists for human $V\gamma 9^+$ T cells have been synthesized, as BrHPP⁷ or aminobisphosphonates (NBP)⁸, several studies involving macaque monkeys^{9,10} and clinical trials in cancer patients have demonstrated *in vivo* the potential of PAg-activated $V\gamma 9^+$ T cells for cancer immunotherapies¹¹. The efficiency of these clinical trials is always associated with an increase of the number of $V\gamma 9^+$ T cells. However, the proliferation of PAg or NBP-activated $V\gamma 9^+$ T cells either *in vitro* or *in vivo* requires an exogenous supply of IL-2 which represents a limitation of these trials because of its toxicity. All advantages and drawbacks of co-injection of PAg/IL-2 described in the review of Fournie *et al.* highlight the need for investigating new methods that will activate $V\gamma 9^+$ T cells using IL-2-free protocols.

IL-33 is a cytokine initially found associated with the chromatin in the nucleus of endothelial cells from High Endothelial Venules (HEV) and thus designated NF-HEV (Nuclear Factor from HEV)^{12,13}. This is the ligand of ST2, a member of the IL-1 receptor family belonging to the Toll-like receptor (TLR)/IL-1R (TIR) superfamily¹⁴. IL-33 is constitutively expressed by HEVs, specialized blood vessels mediating lymphocytes recruitment in lymphoid organs,¹² by endothelial cells in many normal human tissues, epithelial cells, dermal fibroblasts and keratinocytes in tissues exposed to the environment¹⁵. In abnormal circumstances, IL-33 can also be highly expressed during a mechanical or an UV stress^{16,17}, in atherosclerosis¹⁸ and in inflammatory and autoimmune diseases such as asthma^{19,20}. Finally, IL-33 is abundantly

expressed in the nucleus of endothelial cells in human tumor tissues such as kidney, stomach, liver and pancreas ¹⁵.

IL-33, inactivated by caspase cleavage during apoptosis, is not secreted from cells as most cytokines but released passively during necrosis of damaged cells. It was thus proposed similar to an alarmin, alerting the immune system by promoting chemoattraction and activation of innate and adaptive immunity ^{21,22}. When released, IL-33 exerts a dual function amplifying both Th1 and Th2-polarized immune responses according to the cells expressing ST2. IL-33 promotes the recruitment of Th2 T cells and eosinophils *in vitro* and *in vivo* to an inflammatory lesion and induces the cytokine production IL-5 and IL-13 by Th2 lymphocytes ^{14,23,24}. It also strongly activates type 2 innate lymphoid cells (ILC2) and mast cells when administrated in mouse ²⁵⁻²⁷. Human blood derived basophils respond to IL-33 by production of several pro-inflammatory cytokines and enhanced adhesion, integrin expression, chemotaxis, degranulation and survival ^{20,26,28,29}. IL-33 also induces up-regulation of cell-surface expression of MHC class II molecules and CD86 on dendritic cells ³⁰. Moreover, IL-33 administration also amplifies immunoregulatory CD11b⁺ Gr-1⁺ myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) and CD4⁺ CD25^{hi} FoxP3⁺ regulatory T cells in mice ³¹.

On the opposite, IL-33 increases *in vitro* production of IL-4 and IFN- γ by human iNKT ²⁶ and in association with IL-12 enhances iNKT and NK cell production of IFN- γ . Moreover, IL-33 enhanced clonal expansion of iNKT in IL-33-treated mice ²⁸. In addition, IL-33 induces NK cells and CD8 T cells cytotoxic activity *in vitro* ³² and can drive protective antiviral CD8 T cells responses *in vivo* ³³. Thus, IL-33 is a multi-talented immune player that promotes both Th2 and Th1 immune responses. However, despite a large literature on these actions, its impact on $\gamma\delta$ T cells has never been studied.

Detection of tumor-infiltrating V γ 9⁺ T cells in a broad spectrum of malignancies and expression of IL-33 in numerous human tumor tissues lead us to examine the biological properties of this alarmin/cytokine on the functions of V γ 9⁺ T cells.

We found that IL-33 amplifies *in vitro* PAg-activated V γ 9⁺ T cells. The combination of PAg and IL-33 is as effective as the classical association PAg/IL-2 for the promotion of V γ 9⁺ T cell anti-cancer functions in term of both cytokine expression and direct tumor cell lysis. Moreover, we highlighted in this study an original mechanism for the IL-33-induced proliferation of V γ 9⁺ T cells which is an indirect mechanism exclusively depending on a contact of V γ 9⁺ T cells with

CD4 T cells. Thus, we consider this molecule as a novel potential cytokine which could replace the toxic exogenous IL-2 in PAg-activated V γ 9⁺ T cell-based clinical trials.

Materials and methods

Antibodies and reagents

The following conjugated mAbs to human molecules were used: FITC-conjugated anti-TCR V γ 9 and anti-perforin, PE-conjugated anti-CD3, anti-CD8, anti-TCR V γ 9, anti-IFN- γ and anti-TRAIL, PE-Cy5-conjugated anti-CD107a, PE-Cy7-conjugated anti-IL-4, anti-CD25, anti-CD27 and anti-TNF- α , APC-conjugated anti-IL-10, Alexa Fluor 647-conjugated anti-Granzyme B and their respective isotype controls purchased from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France); FITC-conjugated anti-CD7, anti-CD161, anti-CCR5, anti-CXCR3 and anti-CRTH2, PE-conjugated anti-CCR6, PE-Cy5-conjugated anti-CD28, PE-Cy7-conjugated anti-CCR6, Pacific Blue-conjugated anti-IL-17a, anti-CD19, and anti-CD45RA, Brilliant violet 421-conjugated anti-CD3, anti-CD4 and anti-CD117, Brilliant violet 570-conjugated anti-CD3 and anti-CD56, APC-conjugated anti-TCR V γ 9, APC-Cy7-conjugated anti-CD14 and anti-CD20 and their corresponding isotype controls from Ozyme (Saint-Quentin en Yvelines, France); PE-conjugated anti-NKG2D, PE-Cy5-conjugated anti-CD56, PE-Cy7-conjugated anti-CD4, anti-CD16 and anti-CD127 and their respective isotype controls from Beckman Coulter (Villepinte, France); PE-conjugated anti-CD1c, anti-CD141, anti-CD304 and anti-NKG2A and their corresponding isotype controls from Miltenyi Biotec (Paris, France); PE-Cy7-conjugated and APC-Cy7-conjugated anti-CD3 purchased from Clinisciences (Nanterre, France); APC-conjugated anti-KIR and its isotype control were gifted by Innate Pharma (Marseille, France); PE-conjugated anti-hST2 and its isotype controls were purchased from R&D Systems (Lille, France).

BrHPP was provided by Innate Pharma. α -BTN3A mAb was given by Daniel Olive (CIML, Marseille, France). rhIL-2 was from Sanofi-Aventis (Toulouse, France). rhIL-33₁₁₂₋₂₇₀ was kindly gifted by JP Girard's team (IPBS, Toulouse France). Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) was purchased from Life Technologies (Saint-Aubin, France). Brefeldin A and 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI) were from Sigma Aldrich (Lyon, France). Chromium-51 radionuclide was obtained from Perkin Elmer (Courtaboeuf, France).

V γ 9⁺ T cell cultures

Human PBMC were isolated from healthy donors using density gradient centrifugation with Ficoll-Paque Plus (Thermo Fischer Scientific, Illkirch, France) and cultured at $1.5 \cdot 10^6$ cells / ml in RPMI 1640 (Lonza, Les Mureaux, France) supplemented with 2 mM L-glutamine (Lonza), 100 μ g/ml streptomycin, 100 IU/ml penicillin, 1 mM sodium pyruvate (PAA, Velizy-Villacoublay, France) and 10% Fetal clone I (Thermo Fischer Scientific), referred later as complete medium. To obtain V γ 9 primary cell lines ($\gamma\delta$ -pcl) containing more than 50% of V γ 9⁺ T cells, BrHPP 3 μ M was added to the PBMC culture at day 0 and 400 IU/ml of rhIL-2 (IL-2 $\gamma\delta$ -pcl) or rhIL-33 (100, 500 or 1000 ng/ml) (IL-33 $\gamma\delta$ -pcl) were added at day 0 and every 3 days.

Proliferation assays

Freshly isolated V γ 9⁺ T cells ($\gamma\delta$, purity \geq 90%) were obtained by negative magnetic cell sorting (Miltenyi Biotec) from freshly isolated PBMC.

Specific population depletions were performed from freshly isolated PBMC by positive magnetic cell sorting (Miltenyi Biotec) targeting: CD14, CD19, CD4, CD8, CD56, CD1c, CD141 or CD304. For ILC2 isolation, PBMC were stained with lineage markers CD3, CD14, CD20, CD56 and CD117 and CD127 and the cells were sorted by automatic fluorescent cell sorting with the BD FACSAria III.

$\gamma\delta$, PBMC and depleted PBMC were labeled with CFSE 1 μ M for 8 min at 37°C and cultured ($1.5 \cdot 10^5$ to $3 \cdot 10^5$ cells / ml) in 96-well plates in complete medium with BrHPP (100 nM) or IPP (1 μ M) or zoledronate (10 μ M) or α -BTN3A 20.1 mAb (10 μ g/ml) and rhIL-33 (100, 500 or 1000 ng/ml) or rhIL-2 (100 IU/ml) for 6 days. For the specified experiments, blocking anti-CD25 mAb (10 μ g/ml) or blocking anti-IL-2 (20 μ g/ml) or their respective isotype control (R&D System) were added in the culture. Then, CFSE dilution in TCR V γ 9⁺ CD3⁺ cells was evaluated by flow cytometry analysis.

For the proliferation assay using the Transwell system, magnetically purified CD4 T cells ($5 \cdot 10^4$) were placed in the upper chamber and CD4 T cell-depleted PBMC ($2 \cdot 10^5$) were placed in the lower chamber in complete medium (96-Multiwell Insert System; BD Biosciences) then cultured for 6 days as described above.

Phenotype and intracellular expression of cytokines and lytic granules

5.10⁵ cells from IL-33 $\gamma\delta$ -pcl or IL-2 $\gamma\delta$ -pcl were stained for the described surface markers and analyzed by flow cytometry analysis.

For intracellular cytokine and lytic granule expression, cells from IL-33 $\gamma\delta$ -pcl or IL-2 $\gamma\delta$ -pcl were co-cultured for 4 hours with Daudi cells (effector/target ratio 1:1) in 96-well plates in complete medium with Brefeldin A 10 μ g/ml. Then, cells were fixed with PBS 2% paraformaldehyde and permeabilized with PBS 5% FCS 1% saponin (Sigma-Aldrich) and stained for 30 min with the specified mAb for flow cytometry analysis.

Cytotoxicity assay

IL-33 $\gamma\delta$ -pcl or IL-2 $\gamma\delta$ -pcl were co-cultured with Daudi cells (effector/target ratio: 1/1) in 96-well plates in complete medium with anti-CD107a mAb (5 μ g/ml) and with or without anti-FasL, anti-TRAIL or both (10 μ g/ml). After 4 hours, cells were stained with anti-TCR V γ 9, anti-CD3 and anti-CD20 mAbs, and then resuspended in PBS + DAPI (10 μ g/ml). Analysis of CD107a expressed by V γ 9⁺ T cells and DAPI staining of Daudi cells were performed by flow cytometry.

⁵¹Cr release assay

Cells from IL-33 $\gamma\delta$ -pcl or IL-2 $\gamma\delta$ -pcl were co-cultured with Daudi cells at 3 effector/target ratio 30:1, 10:1, 3:1 for 4 hours in 96-well plates in complete medium. Specific lysis by cells from IL-33 $\gamma\delta$ -pcl or IL-2 $\gamma\delta$ -pcl was measured by standard ⁵¹Cr release assays. The lysis rates were obtained by (experimental release - spontaneous release) / (maximum release - spontaneous release) x 100.

IL1RL1 gene expression analysis

Raw data files were downloaded from the NCBI repository GEO database. These comprised 12 samples of highly purified TCRV γ 9⁺ gd cells (>98% purity) : 4 “resting controls” samples, 4 “6h after activation” samples and 4 “7 days after activation” samples (from GSE27291 ³⁴). Data were analyzed with GEO2R platform and the relative mRNA expression profile of IL1RL1 was obtained with data of IL1RL1 expression normalized with data of GAPDH expression.

Flow cytometry analysis

Flow cytometry analysis were performed on BD LSRII cytometer (BD Biosciences) and data were processed with Cytobank software (www.cytobank.org).

Statistical analysis

Data are expressed as means + SEM, as specified in the legends of the figures. Differences between groups were analyzed using paired two-tailed Student's t-test for experiments with $n \geq 5$ independent experiments or Wilcoxon's test for experiments with $n < 5$ independent experiments. Statistical analysis were performed with the software Prism.

Results**IL-33 induces *in vitro* proliferation of human V γ 9⁺ T cells**

In vitro proliferation of BrHPP-activated V γ 9⁺ T cells requires the presence of exogenous IL-2. Here, we tested if IL-33 is able to induce proliferation of these cells as IL-2 does. CFSE-stained freshly isolated PBMC were cultured for six days in the presence of BrHPP and IL-2 or IL-33 at different doses. Figure 1A shows the CFSE dilution on the gated V γ 9⁺ T cells when cultured with BrHPP and IL-2 or IL-33. We observed that IL-33, as IL-2, induces the BrHPP-activated V γ 9⁺ T cell proliferation in a dose-dependent manner. The percentage of divided V γ 9⁺ T cells reached about 80% in the two cases (Figure 1B). From a culture of PBMC containing about 1% of V γ 9⁺ T cells (0,1 million), we obtained after 9 days of culture about 85% of V γ 9⁺ T cells (13 millions) in the presence of IL-2 and an average of 50% with IL-33 (5 millions) (Figure 1C, 1D). Existence of other V γ 9⁺ T cells specific activators led us to test the effect of IL-33 in combination with zoledronate which is an ABP, and isopentenyl pyrophosphate (IPP), a natural PAg. Considering the recent advances in the field of V γ 9⁺ T cell PAg activation by the discovery that anti-BTN3A 20.1 antibody specifically activates V γ 9⁺ TCR³⁵, we tested the combination of IL-33 and this antibody on the proliferation of V γ 9⁺ T cells. We found that the enhanced proliferation of V γ 9⁺ T cells in the presence of IL-2 or IL-33 was equivalent when cells were

activated by the zoledronate or the α -BTN3A 20.1 antibody instead of the BrHPP. IL-33 also increases IPP-activated $V\gamma 9^+$ T cell proliferation but in a lesser extent than IL-2.

IL-33 or IL-2-induced $V\gamma 9^+$ T cells display the same antitumor functions

Given that IL-33 promotes the proliferation of $V\gamma 9^+$ T cells, we investigated how it can modulate $V\gamma 9^+$ T cell phenotype and functions. First, we generated primary cell lines of $V\gamma 9^+$ T cells by culturing during 9 days freshly isolated PBMC with a combination of BrHPP and IL-33 (IL-33 $\gamma\delta$ -pcl) or BrHPP and IL-2 (IL-2 $\gamma\delta$ -pcl).

We analyzed by flow cytometry the expression of some surface markers classically expressed on $V\gamma 9^+$ T cells, as chemokines receptors (CCR5, CCR6, CXCR3) or molecules implicated in costimulation (CD16, CD28, KIR, NKG2D, NKG2A) or cytotoxicity (TRAIL, CD161). Figure 2A shows that IL-2 $\gamma\delta$ -pcl and IL-33 $\gamma\delta$ -pcl display exactly the same profile of molecule expression regarding the tested markers. Moreover, the majority of IL-33-induced $V\gamma 9^+$ T cells exhibit an effector/memory phenotype (CD27⁻ CD45RA⁻) such as the IL-2-induced $V\gamma 9^+$ T cells (Figure 2B). Then, we studied the anti-cancer functions of these two types of $\gamma\delta$ -pcl. In this purpose, we performed co-cultures of these $\gamma\delta$ -pcl with the Daudi lymphoma cell line. We showed that $V\gamma 9^+$ T cells from IL-33 $\gamma\delta$ -pcl express IFN- γ in the same proportion than those from IL-2 $\gamma\delta$ -pcl upon a contact with Daudi cells, without significant distinction between the different doses of IL-33 (Figure 2C and S1A). However, the proportion of $V\gamma 9^+$ T cells expressing TNF- α is significantly increased in IL-33 $\gamma\delta$ -pcl induced with 100 or 500 ng/ml of IL-33, compared to IL-2 $\gamma\delta$ -pcl (Figure 2C and S1B). Moreover, such as IL-2, IL-33 doesn't modify the expression of IL-4, IL-10 or IL-17 (Figure S1C). Concerning the cytolytic functions, we analyzed the intracellular perforin and granzyme B expression by $V\gamma 9^+$ T cells and showed no significant differences between IL-33 $\gamma\delta$ -pcl and IL-2 $\gamma\delta$ -pcl (Figure 2D). Then, we tested the antitumor efficacy of these $V\gamma 9^+$ T cells against the Daudi lymphoma cell line. We analyzed the expression of CD107a by $V\gamma 9^+$ T cells and evaluated the lysis of the Daudi targets either with the staining by the viability marker DAPI or in a standard ⁵¹Cr release assay. We observed a similar expression of CD107a by $V\gamma 9^+$ T cells in IL-33 $\gamma\delta$ -pcl compared to those in IL-2 $\gamma\delta$ -pcl upon a contact with Daudi cells (Figure 2E). Moreover, we obtained a similar level of DAPI⁺ Daudi cells and ⁵¹Cr release when Daudi cells were co-cultured with IL-33 $\gamma\delta$ -pcl or with IL-2 $\gamma\delta$ -pcl (Figure 2F and 2G). $V\gamma 9^+$ T cells exert their cytotoxic functions against cancer through different

mechanisms, including surface expression of TNF-family death receptor ligands TRAIL and Fas ligand (FasL). So we tested if blocking of FasL, TRAIL or both could modulate the cytotoxic activity of IL-33 $\gamma\delta$ -pcl. We showed that used alone or in combination, blocking antibodies anti-FasL and anti-TRAIL didn't decrease the cytotoxic activity of IL-33 $\gamma\delta$ -pcl or IL-2 $\gamma\delta$ -pcl (Figure 2F).

Thus, $V\gamma 9^+$ T cells amplified by a combination of BrHPP and IL-33 display a Th1-polarized phenotype and anti-tumor functions through IFN- γ and TNF- α expression and cytotoxic properties.

IL-33-induced $V\gamma 9^+$ T cell proliferation is CD4 T cells contact-dependent and CD25-dependent

To elucidate the mechanism of the IL-33-induced $V\gamma 9^+$ T cells proliferation, we tested first if the IL-33 could have a direct effect on the $V\gamma 9^+$ T lymphocytes. Thus, we analyzed the ST2 expression by unstimulated or BrHPP/IL-33-activated $V\gamma 9^+$ T cells. We showed that these cells didn't express ST2 at their surface when stimulated or not with BrHPP and IL-33 (Figure 3A). This was confirmed by the absence of expression of ST2 gene (IL1RL1) by unstimulated or BrHPP-stimulated $V\gamma 9^+$ T cells as shown in the transcriptomic data in figure 3B. We also measured the proliferation of magnetically purified $\gamma\delta$ T cells from freshly isolated PBMC analyzing their CFSE dilution in the presence of BrHPP and IL-33. In agreement with the absence of expression of ST2 by $V\gamma 9^+$ T cells, we observed no CFSE dilution in $\gamma\delta$ when they are cultured with IL-33 compared to the culture with IL-2 (Figure 3C). Thus, IL-33 didn't induce the proliferation of purified BrHPP-activated $V\gamma 9^+$ T cells compared to IL-2 and we concluded for an indirect effect of IL-33 on this proliferation.

Since IL-33 can activate different cell types resulting in a large broad of biological effects as described in the literature, we suggest a mechanism involving a by-stander population. To find which cells are involved in the $V\gamma 9^+$ T cell proliferation via IL-33, we performed experiments with freshly isolated PBMC depleted in different cell types. ILC2, a minority population of PBMC, were recently identified as an important target of IL-33. Thus, we tested if the depletion of ILC2 could be implicated in the IL-33-induced $V\gamma 9^+$ T cell proliferation. First, we verified the presence of ILC2 in fresh PBMC based on their previously described phenotype²⁵ (Figure 4A). Then we isolated ILC2 and $V\gamma 9^+$ T cells using fluorescent cell sorting and cultivated these cells

together with IL-2 or IL-33. We showed that IL-33 didn't induce the proliferation of $V\gamma 9^+$ T cells in the presence of ILC2 (Figure 4B).

Then, we analyzed the proliferation of $V\gamma 9^+$ T cells from PBMC cultures depleted in $CD4^+$ or $CD8^+$ or $CD56^+$ or $CD19^+$ or $CD14^+$ cells or dendritic cells. First, we showed that depletion of $CD8^+$ or $CD56^+$ or $CD19^+$ or $CD14^+$ or dendritic cells had no impact on IL-33-induced $V\gamma 9^+$ T cell proliferation. However, depletion of $CD4^+$ T cells drastically inhibited the IL-33-induced $V\gamma 9^+$ T cell proliferation compared to undepleted PBMC and to the culture with IL-2 (Figure 5A).

Then, we tested if the contact of $V\gamma 9^+$ T cells with the $CD4^+$ T cells was essential to their proliferation in the presence of IL-33. We analyzed the proliferation of $V\gamma 9^+$ T cells in $CD4^+$ T cell-depleted PBMC with $CD4^+$ T cells placed in the upper compartment of a Transwell® insert (Tw) system. We showed that whereas the separation by the Tw system didn't inhibit the IL-2 induced $V\gamma 9^+$ T cells proliferation, the separation between $CD4^+$ T cells and $CD4^+$ T cells-depleted PBMC prevented the induction of the proliferation by the IL-33. Furthermore, such as IL-2, IL-33 induced $V\gamma 9^+$ T cell proliferation in a reconstituted system with purified $\gamma\delta$ and purified $CD4^+$ T cells (Figure 5B).

IL-2 is an essential growth factor for T lymphocytes, including $\gamma\delta$ T cells, and $CD4^+$ T cells are the major source of IL-2 in the mononuclear cells. Therefore, we measured the IL-2 level in supernatants of PBMC cultured in the presence of BrHPP and IL-33. We found that increased IL-33 concentration did not raise the IL-2 concentration in the culture supernatant (not shown). However, IL-33-induced $V\gamma 9^+$ T cells proliferation was completely abolished when PBMC were cultured in the presence of anti-IL-2 blocking antibody (Figure 5C). Moreover, we showed that CD25 blocking on PBMC cultured with IL-33 decreased drastically the $V\gamma 9^+$ T cell proliferation (Figure 5D). Finally, we tested CD25 expression by $V\gamma 9^+$ T cells and $CD4^+$ T cells in cultures of PBMC in the presence or absence of BrHPP and with or without IL-33 or IL-2. The figure 5E shows that PAg-activated $V\gamma 9^+$ T cells express CD25 which is increased by IL-33 and decreased by IL-2. On the other side, $CD4^+$ T cells expressed a very small amount of CD25 in the presence of IL-2 or IL-33.

Thus, the proliferation of BrHPP-activated $V\gamma 9^+$ T cells induced with IL-33 requires a contact between $V\gamma 9^+$ T cells and $CD4^+$ T cells and involved the CD25 receptor.

Discussion

IL-33 has emerged as a pleiotropic immune regulator, implicated in both Th2/regulatory and Th1 type immune responses³⁶. However, despite its proven multifunction on Th2 cells, CD8⁺ T cells and NK cells, the IL-33 immunomodulation had never been studied on $\gamma\delta$ T cells and particularly on human V γ 9⁺ T cells, an important anti-tumor immune cell type.

In this study, we showed that IL-33 induce proliferation and amplification of PAg-activated V γ 9⁺ T cells. We evidenced bystander population dependence for this induction. This was first supported by no expression of the IL-33 receptor ST2 by V γ 9⁺ T cells and no proliferation of freshly sorted V γ 9⁺ T cells in the presence of PAg and IL-33. Actually, PBMC cultures depleted in different populations showed that CD4⁺ T cells were essential to the proliferation of V γ 9⁺ T cells thanks to IL-33 while this proliferation via IL-2 is not dependent on another cell population. CD4⁺ T cells were already described as helper cells for the V γ 9⁺ T cell proliferation activated by *Mycobacterium tuberculosis*, known to produce PAg³⁷. In this study they found that the helper effect of CD4⁺ T cells was mediated by soluble factors as IL-2. Thus, we investigated if IL-33 stimulation could activate IL-2 production in the culture supernatant and IL-2 expression by CD4⁺ T cells. We didn't find increasing amount of IL-2 in the supernatant of cultures with IL-33. However, blocking of the α -chain of IL-2 receptor by an anti-CD25 antibody or blocking of soluble IL-2 with an anti-IL-2 antibody inhibited drastically the V γ 9⁺ T cell proliferation. Thus, endogenous IL-2 is necessary in the IL-33-induced proliferation. The increase expression of CD25 by V γ 9⁺ T cells in the presence of IL-33 could explain the undetectable increase of IL-2 in the supernatant with the direct capture of IL-2 by V γ 9⁺ T cells. This can be support by an autocrine IL-2 production by V γ 9⁺ T cells. Indeed, TCR activation has been shown to induce autocrine IL-2 production that promotes survival and proliferation of V γ 9⁺ T cells³⁸. Moreover, these authors showed that CD28 expressed by naïve V γ 9⁺ T cells synergizes with the TCR to induce autocrine IL-2 production by V γ 9⁺ T cells. Sperling et al. also showed that CD28-mediated costimulation is necessary for the activation of TCR- $\gamma\delta$ T cells and can occur through CD28 interaction³⁹. Given that the contact with CD4⁺ T cells was absolutely necessary to the V γ 9⁺ T cell proliferation in the presence of IL-33 and that CD4⁺ T cells are able to express B7, the ligand of CD28⁴⁰, V γ 9⁺ T cells could interact with CD4⁺ T cells through the interaction CD28/B7 to induce autocrine IL-2 production. Moreover, it is well known that

additional stimulation from adhesive interactions between costimulatory receptors on T cells and their ligands on APC lead to optimal proliferation of T cells initiated via ligation of the CD3/TCR complex⁴¹. Lots of these receptors and ligands have been described as expressed by T cells. The interaction CD40/CD40L could also be involved in the costimulation V γ 9⁺ T cells / CD4⁺ T cells when this interaction was described as inducer of CD25 expression by V γ 9⁺ T cells⁴². Thus, we can speculate on an induction of autocrine IL-2 production by the interaction of V γ 9⁺ T cells and CD4⁺ T cells coupled to an increase of CD25 expression by V γ 9⁺ T cells when these cells are cultured in the presence of IL-33. However, if literature shows several examples of polarized CD4⁺ T cells activated by IL-33, in our hands no ST2 antibody detected this receptor on naïve CD4⁺ T cells or on these cells in PBMC cultivated with IL-33. Thus, the role of IL-33 on CD4⁺ T cells in our system remains unclear and will be investigated with a global approach of gene expression profile.

Beside the induction of proliferation, we showed that the IL-33-induced V γ 9⁺ T cells express Th1 type cytokines expression IFN- γ and TNF- α , without increasing of IL-4. Interestingly, IL-33 has been found to be a better inducer than IL-2 for the TNF- α expression by V γ 9⁺ T cells. Furthermore, V γ 9⁺ T cells amplified by culture with a combination of BrHPP and IL-33 display high direct cytotoxic functions against tumor cell lines as IL-2 induced V γ 9⁺ T cells. This cytolytic functions highlight the potential of PAg-activated V γ 9⁺ T cells for cancer immunotherapy already demonstrated in vivo but limited by the toxicity of IL-2 essential in these therapies. The efficacy of these clinical trials is always associated with an increase of V γ 9⁺ T cell compartment due to the proliferation induction by IL-2. Given our results, IL-33 could be an alternative to IL-2 in these V γ 9⁺ T cell-based immunotherapies. Furthermore, the abundant expression of IL-33 by endothelial cells in various human tumor tissues¹⁵ leads to the question of the impact of this cytokine on immune cells such as $\gamma\delta$ T cells which can be observed in the microenvironment of the tumor. Our study showed that not only IL-33 would not be a suppressive cytokine but in addition could sustain a strong Th1-polarized immune response of V γ 9 T cells as described recently in case of CD8⁺ T cells and NK cells in tumor tissues associated to the inhibition of tumor growth and metastasis by IL-33 expressed by tumor cells⁴³. To conclude, this study suggests that IL-33 could be a promising alternative to IL-2 in V γ 9⁺ T cell-based immunotherapies.

Legends to figures

Figure 1: IL-33 induces BrHPP-activated V γ 9⁺ T cell proliferation. **A.** CFSE dilution in V γ 9⁺ T cells after a 6 days culture of PBMC with or without BrHPP 100 nM and with or without 100 IU/ml of IL-2 or IL-33 at three doses (100 ng/ml, 500 ng/ml, 1000 ng/ml). **B.** Mean of the percentages \pm SEM of divided V γ 9⁺ T cells in the presence of IL-2 or three doses of IL-33 (□ : 100, ■ : 500, ■ : 1000 ng/ml) for 10 independent experiments. **C and D.** C. Representative dot plot of the percentages and D. Absolute number of V γ 9⁺ T cells after 9 days of culture of PBMC stimulated by BrHPP 3 μ M and IL-2 (400 IU/ml) or IL-33 (500 ng/ml) (11 independent experiments). **E.** CFSE dilution in V γ 9⁺ T cells after a 6 days culture of PBMC in the presence BrHPP (100 nM) or IPP (10 μ M) or zoledronate (1 μ M) or α -BTN3A 20.1 (10 μ g/ml) and with or without 100 IU/ml of IL-2 or 500 ng/ml of IL-33. Representative histogram overlay of 11 independent experiments. * indicates $p < 0.05$, Student's paired t test.

Figure 2: Cytotoxic activity of IL-33-induced V γ 9⁺ T cells. **A.** Expression of surface receptors by the V γ 9⁺ T cells from an IL-2 $\gamma\delta$ -pCl (black line) or an IL-33 $\gamma\delta$ -pCl (red line) compared to isotype control (filled histogram). Representative histograms of 6 independent experiments. **B.** Different subsets of naïve and memory V γ 9⁺ T cells present in IL-33 $\gamma\delta$ -pCl compared to IL-2 $\gamma\delta$ -pCl. Contour plot representative of 6 independent $\gamma\delta$ -pCl. **C-F.** Co-culture of IL-2 $\gamma\delta$ -pCl or IL-33 $\gamma\delta$ -pCl induced with 100, 500 or 1000 ng/ml of IL-33 with Daudi target cells for 4 hours, with an effector / target ration 1:1. **C.** Intracellular IFN- γ and TNF- α expression by V γ 9⁺ T cells from IL-2 $\gamma\delta$ -pCl or IL-33 $\gamma\delta$ -pCl. Ctrl: $\gamma\delta$ -pCl without target. Representative dot plots out of 7 (IFN- γ) or 4 (TNF- α) independent experiments. **D.** Intracellular expression of perforin and granzyme B by V γ 9⁺ T cells from IL-2 $\gamma\delta$ -pCl or IL-33 $\gamma\delta$ -pCl. Representative histogram overlay of 7 independent experiments. **E.** Expression of CD107a by V γ 9⁺ T cells from an IL-2 $\gamma\delta$ -pCl or an IL-33 $\gamma\delta$ -pCl. Ctrl: $\gamma\delta$ -pCl without target. Representative histogram overlay of 15 independent experiments. **F.** Dapi staining in Daudi cells after 4 hours of co-culture with IL-2 $\gamma\delta$ -pCl or IL-33 $\gamma\delta$ -pCl in the presence or not of blocking antibodies for FasL or TRAIL or both. Representative histogram overlays of 15 independent experiments. **G.** Standard ⁵¹Cr release assay. Mean of the percentages of specific lysis of Daudi cells after 4 hours of co-culture with

IL-2 $\gamma\delta$ -pcl (○) or IL-33 $\gamma\delta$ -pcl (●: 100, ■: 500, ▲: 1000 ng/ml) at three effectors / target ratios (6 independent experiments).

Figure 3: IL-33 has not a direct effect on the $V\gamma 9^+$ T cells. **A.** Relative expression of IL1RL1 mRNA by fresh $V\gamma 9^+$ T cells or activated by BrHPP and IL-2 for 6 hours or 7 days. **B.** ST2 expression by unstimulated (black line) or BrHPP/IL-33 stimulated (dotted line) $V\gamma 9^+$ T cells compared to the isotype control (filled histogram). **C.** CFSE dilution in $V\gamma 9^+$ T cells after 6 days of culture of PBMC or purified $V\gamma 9^+$ T cells with or without BrHPP (100 nM) and IL-2 (100 IU/ml) or IL-33 (500 ng/ml).

Figure 4: Peripheral blood ILC2 are not involved in the IL-33-induced proliferation of $V\gamma 9^+$ T cells. **A.** Upper panel: gating strategy used for cell sorting of ILC2 from freshly isolated PBMC. Lower panel: Phenotype of unstimulated freshly purified ILC2. **B.** CFSE dilution in $V\gamma 9^+$ T cells cultured for 6 days in PBMC or reconstituted system with $\gamma\delta$ and freshly isolated ILC2 with or without BrHPP 100 nM and IL-2 100 IU/ml or IL-33 100, 500 or 1000 ng/ml.

Figure 5: IL-33-induced $V\gamma 9^+$ T cell proliferation is $CD4^+$ T cell contact-dependent and CD25-dependent. **A.** Percentage of divided $V\gamma 9^+$ T cells in BrHPP/IL-2 (□) or BrHPP/ IL-33 (■) activated PBMC depleted in monocytes or dendritic cells or NK cells or B lymphocytes or $CD8^+$ T cells or $CD4^+$ T cells compared to the undepleted PBMC control and to the untreated control (□) (3 independent experiments). * indicates $p < 0.05$, Wilcoxon's test. **B.** CFSE dilution in $V\gamma 9^+$ T cells in cultures of PBMC, $CD4^+$ T cell-depleted PBMC, Transwell® system (bottom: $CD4^+$ T cell-depleted PBMC/top: purified $CD4^+$ T cells) or reconstituted system with $\gamma\delta^+$ purified $CD4^+$ T cells for 6 days with or without BrHPP 100 nM and with or without 100 IU/ml of IL-2 or IL-33 at three doses (100 ng/ml, 500 ng/ml, 1000 ng/ml). **C.** Amplification of PAg activated- $V\gamma 9^+$ T cells in cultures of PBMC with IL-2c or IL-33 for 6 days in the presence of anti-IL-2 blocking antibody or isotype. **C.** Percentage of divided $V\gamma 9^+$ T cells in the presence of BrHPP 100 nM and IL-2 100 IU/ml or IL-33 500 ng/ml and in the presence of anti-CD25 antibody 10 μ g/ml (□) or the isotype control (■) (5 independent experiments). **D.** CD25 expression on $V\gamma 9^+$ T cells and $CD4^+$ T cells cultured as described in C. Representative histogram overlays of 5 independent experiments. * indicates $p < 0.05$, Student's t test.

Supplemental data

Figure S1: V γ 9⁺ T cells induced by IL-33 express Th1 type cytokines upon a contact with tumor cells. Co-culture of IL-2 $\gamma\delta$ -pcl or IL-33 $\gamma\delta$ -pcl induced with 100, 500 or 1000 ng/ml of IL-33 with Daudi target cells for 4 hours, with an effector / target ration 1:1. **A and B.** Means \pm SEM of the percentages of V γ 9⁺ T cells A. IFN- γ ⁺ or B. TNF- α ⁺ in IL-2 $\gamma\delta$ -pcl or IL-33 $\gamma\delta$ -pcl. Ctrl: $\gamma\delta$ -pcl without target (7 (IFN- γ) or 4 (TNF- α) independent experiments). **C.** Intracellular expression of IL-4, IL-10 and IL-17 by V γ 9⁺ T cells from IL-33 $\gamma\delta$ -pcl or IL-2 $\gamma\delta$ -pcl. Ctrl: $\gamma\delta$ -pcl without target. Representative histogram overlays of 6 independent experiments. * indicates $p < 0.05$, Student's t test for IFN- γ expression by IL-33 $\gamma\delta$ -pcl or IL-2 $\gamma\delta$ -pcl in contact with Daudi cells *versus* Ctrl and Wilcoxon's test for TNF- α expression.

References

1. Poupot M, Fournie JJ. Non-peptide antigens activating human Vgamma9/Vdelta2 T lymphocytes. *Immunol Lett.* 2004;95(2):129-138.
2. Gober HJ, Kistowska M, Angman L, Jeno P, Mori L, De Libero G. Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J Exp Med.* 2003;197(2):163-168.
3. Bonneville M. Forum in immunology. Introduction. Non-conventional T cells: useful or harmful players in microbial immunity? *Microbes Infect.* 2005;7(3):501-502.
4. Kabelitz D, Wesch D, Pitters E, Zoller M. Characterization of tumor reactivity of human V gamma 9V delta 2 gamma delta T cells in vitro and in SCID mice in vivo. *J Immunol.* 2004;173(11):6767-6776.
5. Groh V, Rhinehart R, Secrist H, Bauer S, Grabstein KH, Spies T. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(12):6879-6884.
6. Corvaisier M, Moreau-Aubry A, Diez E, et al. V gamma 9V delta 2 T cell response to colon carcinoma cells. *J Immunol.* 2005;175(8):5481-5488.
7. Espinosa E, Belmont C, Pont F, et al. Chemical synthesis and biological activity of bromohydrin pyrophosphate, a potent stimulator of human gamma delta T cells. *J Biol Chem.* 2001;276(21):18337-18344.
8. Thompson K, Roelofs AJ, Jauhainen M, Monkkonen H, Monkkonen J, Rogers MJ. Activation of gammadelta T cells by bisphosphonates. *Adv Exp Med Biol.* 2010;658:11-20.
9. Sicard H, Ingoure S, Luciani B, et al. In vivo immunomanipulation of V gamma 9V delta 2 T cells with a synthetic phosphoantigen in a preclinical nonhuman primate model. *J Immunol.* 2005;175(8):5471-5480.
10. Casetti R, Perretta G, Taglioni A, et al. Drug-induced expansion and differentiation of V gamma 9V delta 2 T cells in vivo: the role of exogenous IL-2. *J Immunol.* 2005;175(3):1593-1598.
11. Fournie JJ, Sicard H, Poupot M, et al. What lessons can be learned from gammadelta T cell-based cancer immunotherapy trials? *Cell Mol Immunol.* 2013;10(1):35-41.
12. Baekkevold ES, Roussigne M, Yamanaka T, et al. Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules. *Am J Pathol.* 2003;163(1):69-79.

13. Carriere V, Roussel L, Ortega N, et al. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(1):282-287.
14. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity*. 2005;23(5):479-490.
15. Moussion C, Ortega N, Girard JP. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'? *PLoS One*. 2008;3(10):e3331.
16. Sanada S, Hakuno D, Higgins LJ, Schreiter ER, McKenzie AN, Lee RT. IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system. *J Clin Invest*. 2007;117(6):1538-1549.
17. Byrne SN, Beaugie C, O'Sullivan C, Leighton S, Halliday GM. The immune-modulating cytokine and endogenous Alarmin interleukin-33 is upregulated in skin exposed to inflammatory UVB radiation. *Am J Pathol*. 2011;179(1):211-222.
18. Miller AM, Xu D, Asquith DL, et al. IL-33 reduces the development of atherosclerosis. *J Exp Med*. 2008;205(2):339-346. Journal Article Journal Article
19. Miller AM. Role of IL-33 in inflammation and disease. *J Inflamm (Lond)*. 2011;8(1):22.
20. Liew FY, Pitman NI, McInnes IB. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(2):103-110.
21. Haraldsen G, Balogh J, Pollheimer J, Sponheim J, Kuchler AM. Interleukin-33 - cytokine of dual function or novel alarmin? *Trends Immunol*. 2009;30(5):227-233.
22. Lefrancais E, Cayrol C. Mechanisms of IL-33 processing and secretion: differences and similarities between IL-1 family members. *Eur Cytokine Netw*. 2012;23(4):120-127.
23. Komai-Koma M, Xu D, Li Y, McKenzie AN, McInnes IB, Liew FY. IL-33 is a chemoattractant for human Th2 cells. *Eur J Immunol*. 2007;37(10):2779-2786.
24. Besnard AG, Togbe D, Guillou N, Erard F, Quesniaux V, Ryffel B. IL-33-activated dendritic cells are critical for allergic airway inflammation. *Eur J Immunol*. 2011;41(6):1675-1686.
25. Mjosberg JM, Trifari S, Crellin NK, et al. Human IL-25- and IL-33-responsive type 2 innate lymphoid cells are defined by expression of CCR4 and CD161. *Nat Immunol*. 2011;12(11):1055-1062.
26. Smithgall MD, Comeau MR, Yoon BR, Kaufman D, Armitage R, Smith DE. IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells. *Int Immunol*. 2008;20(8):1019-1030.
27. Bartemes KR, Iijima K, Kobayashi T, Kephart GM, McKenzie AN, Kita H. IL-33-responsive lineage- CD25⁺ CD44(hi) lymphoid cells mediate innate type 2 immunity and allergic inflammation in the lungs. *J Immunol*. 2012;188(3):1503-1513.
28. Bourgeois E, Van LP, Samson M, et al. The pro-Th2 cytokine IL-33 directly interacts with invariant NKT and NK cells to induce IFN-gamma production. *Eur J Immunol*. 2009;39(4):1046-1055.
29. Suzukawa M, Iikura M, Koketsu R, et al. An IL-1 cytokine member, IL-33, induces human basophil activation via its ST2 receptor. *J Immunol*. 2008;181(9):5981-5989.
30. Rank MA, Kobayashi T, Kozaki H, Bartemes KR, Squillace DL, Kita H. IL-33-activated dendritic cells induce an atypical TH2-type response. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;123(5):1047-1054.
31. Turnquist HR, Zhao Z, Rosborough BR, et al. IL-33 expands suppressive CD11b⁺ Gr-1(int) and regulatory T cells, including ST2L⁺ Foxp3⁺ cells, and mediates regulatory T cell-dependent promotion of cardiac allograft survival. *J Immunol*. 2011;187(9):4598-4610.
32. Gao K, Li X, Zhang L, et al. Transgenic expression of IL-33 activates CD8⁽⁺⁾ T cells and NK cells and inhibits tumor growth and metastasis in mice. *Cancer Lett*. 2013;335(2):463-471. Journal Article Journal Article
33. Bonilla WV, Frohlich A, Senn K, et al. The alarmin interleukin-33 drives protective antiviral CD8⁽⁺⁾ T cell responses. *Science*. 2012;335(6071):984-989.

34. Pont F, Familiades J, Dejean S, et al. The gene expression profile of phosphoantigen-specific human gammadelta T lymphocytes is a blend of alphabeta T-cell and NK-cell signatures. *Eur J Immunol*. 2012;42(1):228-240.
35. Harly C, Guillaume Y, Nedellec S, et al. Key implication of CD277/butyrophilin-3 (BTN3A) in cellular stress sensing by a major human gammadelta T-cell subset. *Blood*. 2012;120(11):2269-2279.
36. Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity*. 2013;39(6):1003-1018.
37. Pechhold K, Wesch D, Schondelmaier S, Kabelitz D. Primary activation of V gamma 9-expressing gamma delta T cells by Mycobacterium tuberculosis. Requirement for Th1-type CD4 T cell help and inhibition by IL-10. *J Immunol*. 1994;152(10):4984-4992.
38. Ribot JC, Debarros A, Mancio-Silva L, Pamplona A, Silva-Santos B. B7-CD28 costimulatory signals control the survival and proliferation of murine and human gammadelta T cells via IL-2 production. *J Immunol*. 2012;189(3):1202-1208.
39. Sperling AI, Linsley PS, Barrett TA, Bluestone JA. CD28-mediated costimulation is necessary for the activation of T cell receptor-gamma delta⁺ T lymphocytes. *J Immunol*. 1993;151(11):6043-6050.
40. Azuma M, Yssel H, Phillips JH, Spits H, Lanier LL. Functional expression of B7/BB1 on activated T lymphocytes. *J Exp Med*. 1993;177(3):845-850.
41. Damle NK, Klussman K, Linsley PS, Aruffo A. Differential costimulatory effects of adhesion molecules B7, ICAM-1, LFA-3, and VCAM-1 on resting and antigen-primed CD4⁺ T lymphocytes. *J Immunol*. 1992;148(7):1985-1992.
42. Ramsdell F, Seaman MS, Clifford KN, Fanslow WC. CD40 ligand acts as a costimulatory signal for neonatal thymic gamma delta T cells. *J Immunol*. 1994;152(5):2190-2197.
43. Gao X, Wang X, Yang Q, et al. Tumoral Expression of IL-33 Inhibits Tumor Growth and Modifies the Tumor Microenvironment through CD8⁺ T and NK Cells. *J Immunol*. 2015;194(1):438-445.

Figure 1

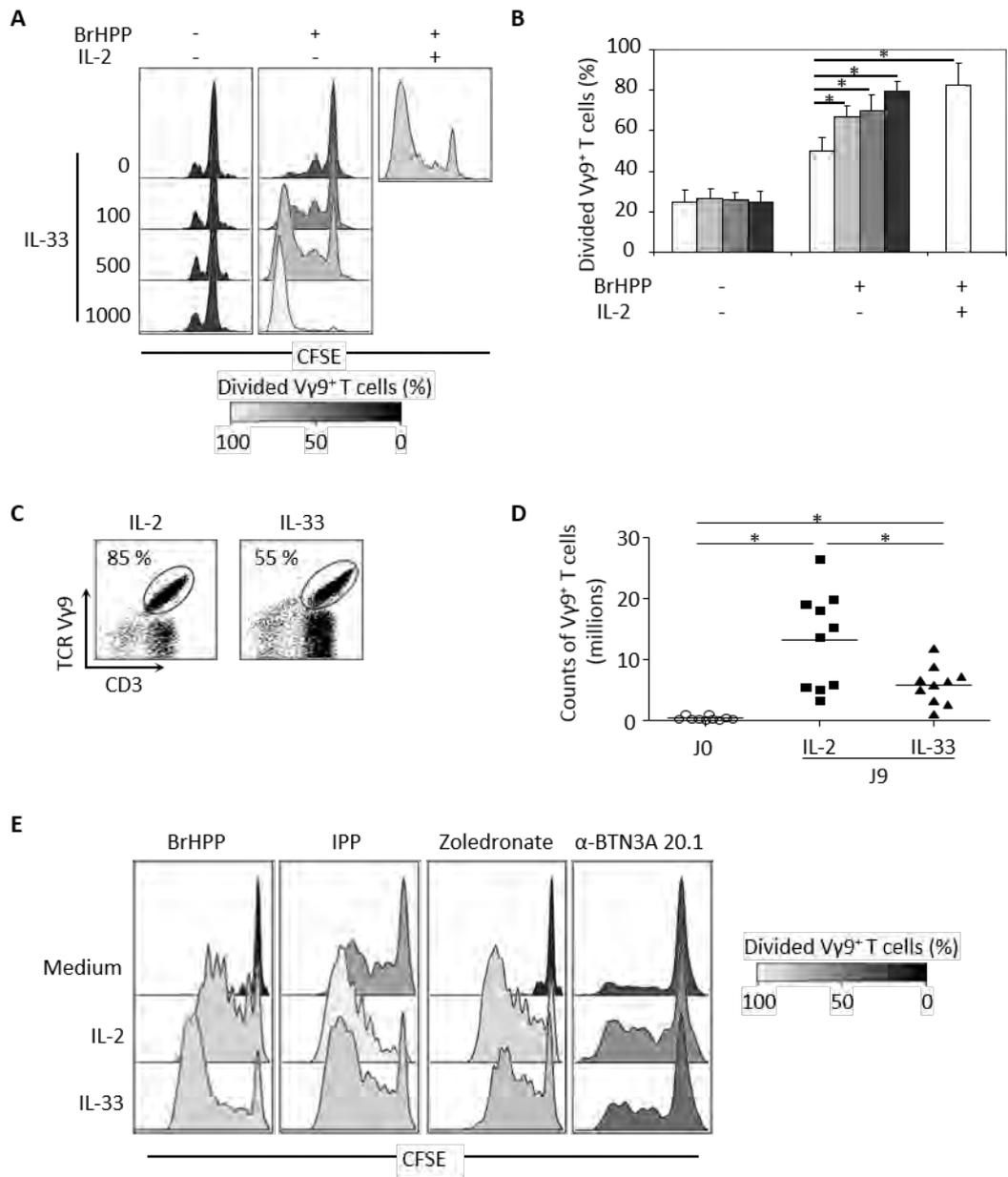


Figure 2

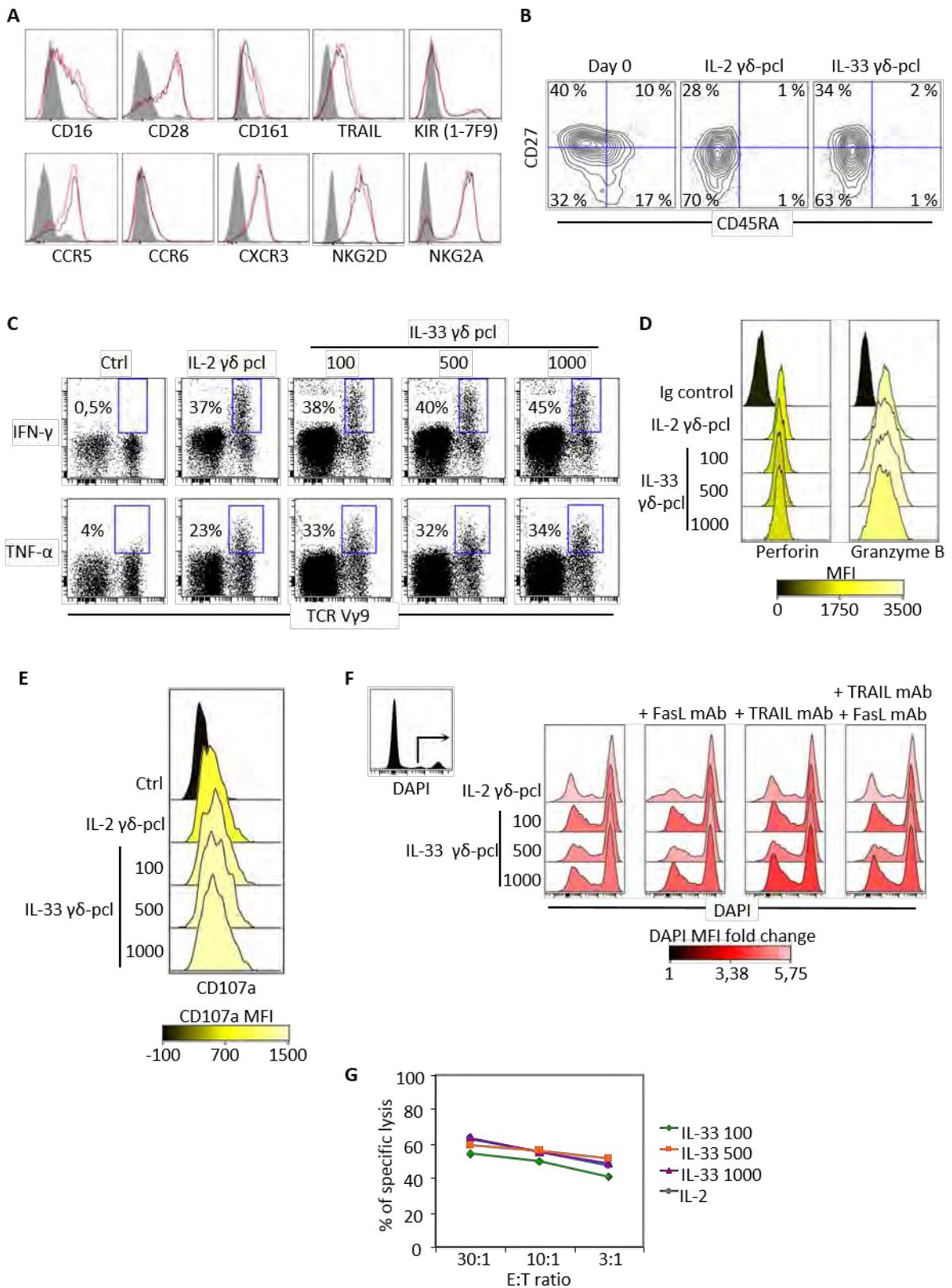


Figure 3

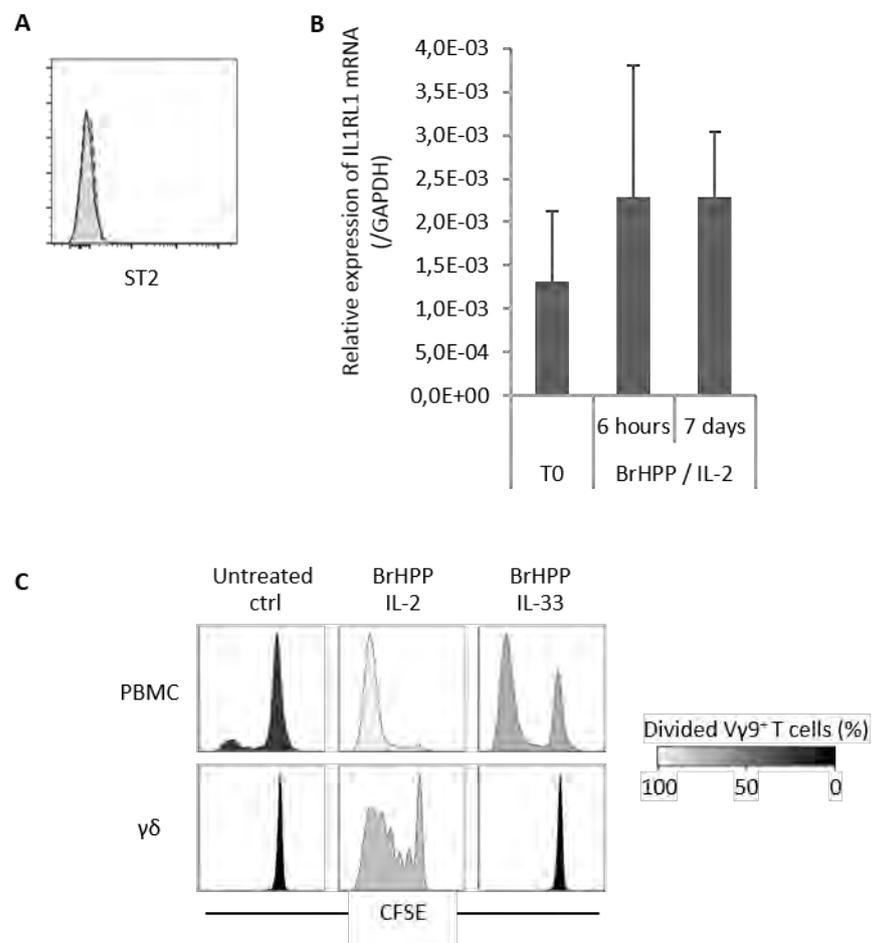


Figure 4

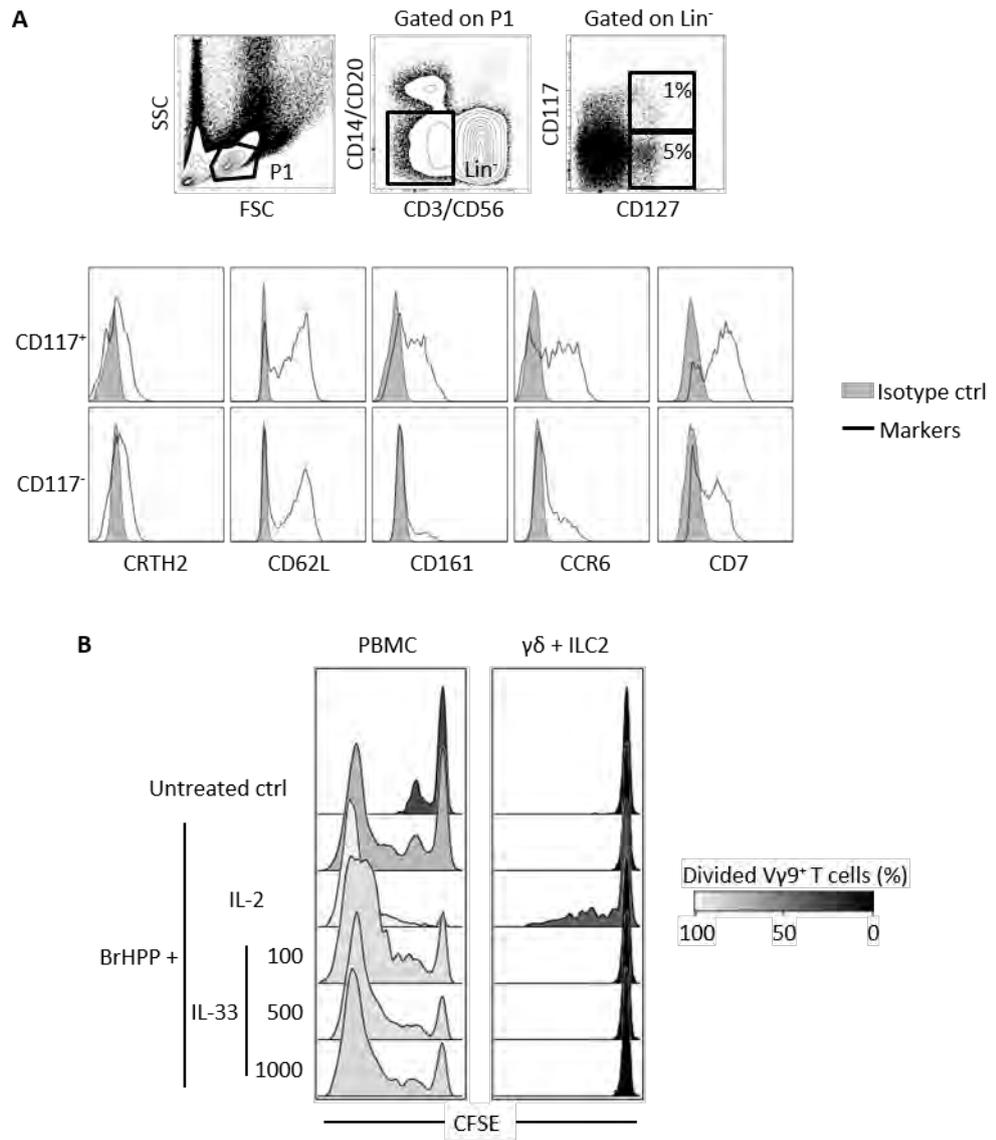
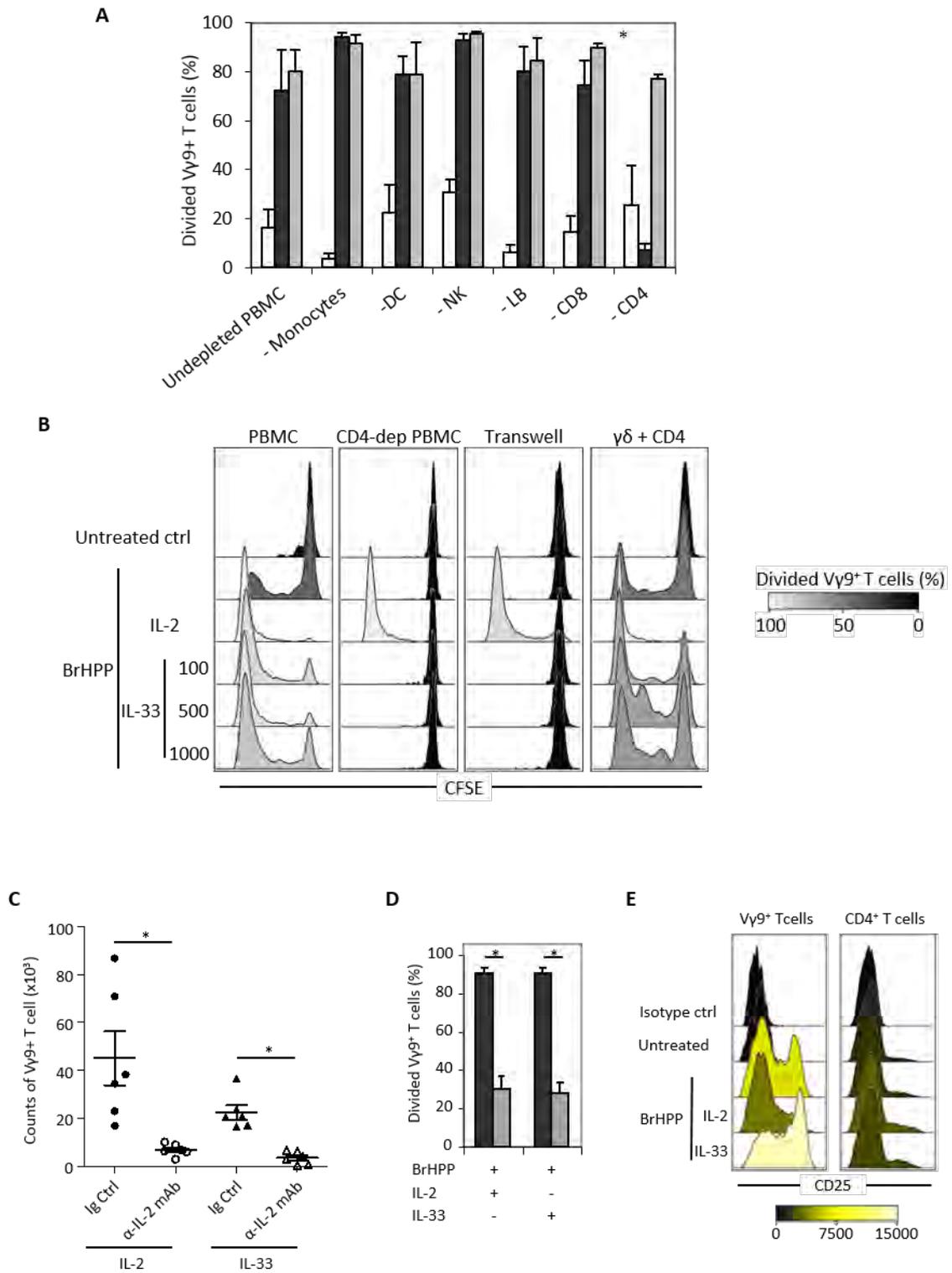
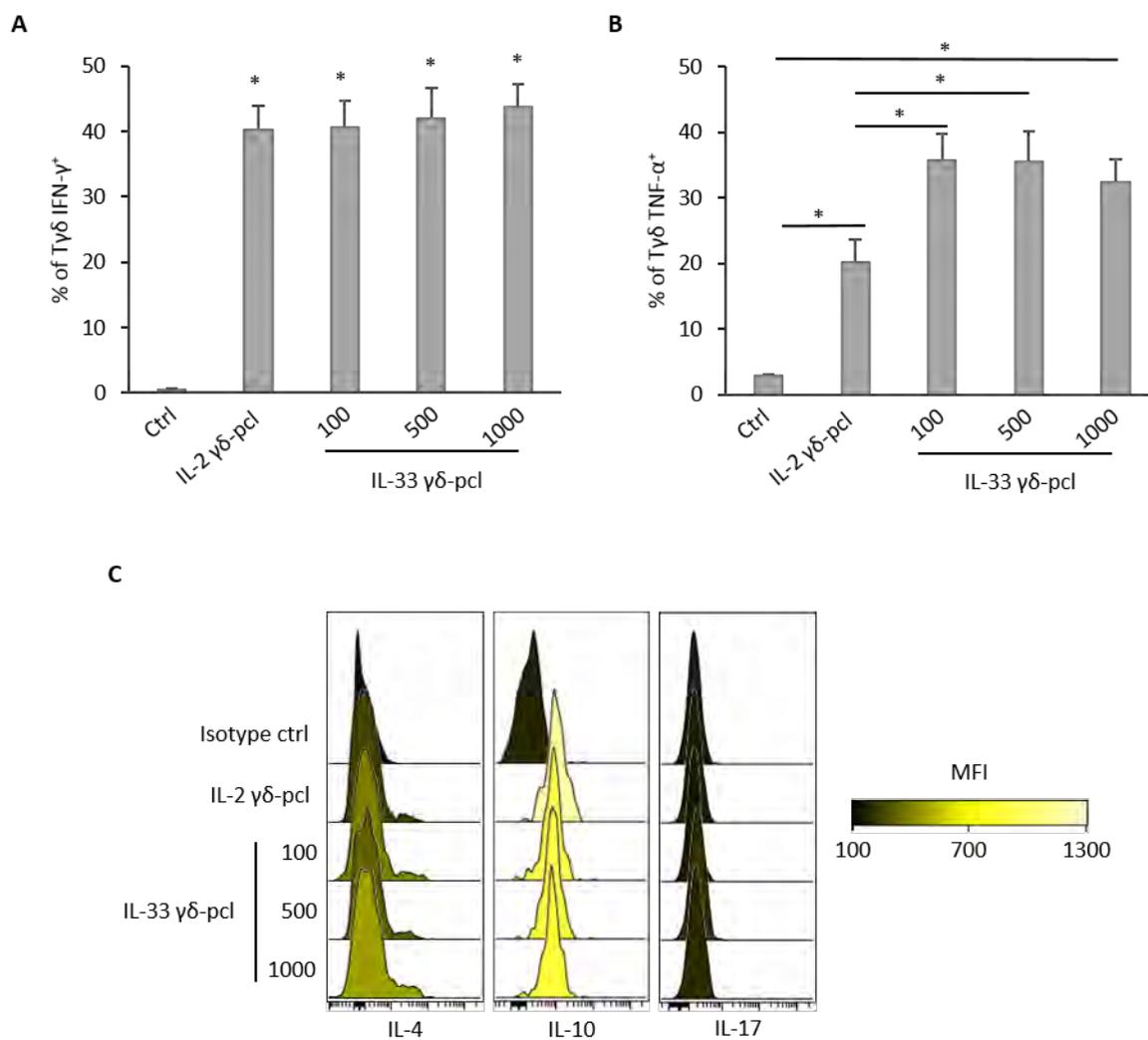


Figure 5



Supplemental data

Figure S1



RESULTATS SUPPLEMENTAIRES

Les lignées IL-33 $\gamma\delta$ -pcl possèdent une activité cytotoxique antitumorale similaire aux lignées IL-2 $\gamma\delta$ -pcl

Nous avons déjà montré que les lignées primaires de lymphocytes T V γ 9V δ 2 induites avec de l'IL-33 (IL-33 $\gamma\delta$ -pcl) ont une activité cytotoxique identique aux lignées primaires induites avec de l'IL-2 (IL-2 $\gamma\delta$ -pcl) vis-à-vis de la lignée de lymphome de Burkitt Daudi. Les cellules Daudi sont connues pour être une très bonne cible des lymphocytes T V γ 9V δ 2. Nous avons donc voulu vérifier si l'activité cytotoxique des lignées IL-33 $\gamma\delta$ -pcl s'exerce sur d'autres types de lignées cancéreuses hématopoïétiques. Pour cela, nous avons généré des lignées IL-33 $\gamma\delta$ -pcl et des lignées IL-2 $\gamma\delta$ -pcl à partir de PBMC de mêmes donneurs sains comme décrit précédemment et nous avons réalisé des tests standards de relargage du ^{51}Cr avec différents types de lignées tumorales telles que RL (lymphome folliculaire), NCEB1 (lymphome du manteau), Raji et Ramos (lymphomes de Burkitt).

Méthodologie :

Des cellules issues de lignées IL-33 $\gamma\delta$ -pcl induites avec 500 ng/ml d'IL-33 ou IL-2 $\gamma\delta$ -pcl ont été mises en culture en milieu complet pendant 4 heures en plaque 96 puits fond rond avec les cibles tumorales NCEB1, RL, Raji ou Ramos préalablement marquées avec l'isotope radioactif ^{51}Cr suivant 3 ratios effecteur/cible 30/1, 10/1 ou 3/1. Le pourcentage de lyse spécifique des cibles tumorales a été mesuré *via* le test standard de relargage du ^{51}Cr et calculé selon la formule (relargage échantillon - relargage spontané)/(relargage maximum - relargage spontané) x 100. Le relargage spontané a été mesuré dans le surnageant de culture des cibles cultivées sans effecteur. Le relargage maximum a été obtenu en mesurant la radioactivité dans les puits contenant à la fois le surnageant et les cibles marquées au ^{51}Cr , sans effecteur.

Résultats :

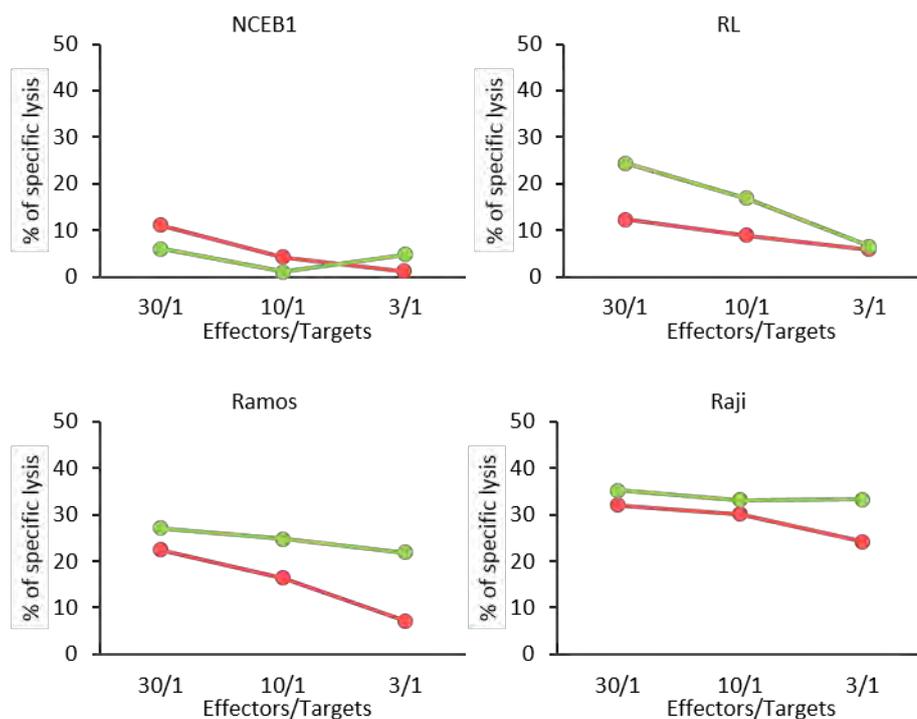


Figure 40 : Les cellules issues des lignées IL-33 $\gamma\delta$ -pcl et IL-2 $\gamma\delta$ -pcl possèdent la même activité cytotoxique vis-à-vis des cibles tumorales hématopoïétiques. Test standard de relargage du ^{51}Cr avec des cellules de lignées IL-33 $\gamma\delta$ -pcl induites avec 500 ng/ml d'IL-33 (●) ou de lignées IL-2 $\gamma\delta$ -pcl (●) mises en co-culture avec les cibles cancéreuses NCEB1, RL, Raji ou Ramos selon les ratios effecteur/cible spécifiés. Les données représentent la moyenne des pourcentages de lyses pour $n=5$ expériences indépendantes.

Bien que les lignées IL-33 $\gamma\delta$ -pcl tendent à avoir une activité cytotoxique moindre vis-à-vis des cibles tumorales RL et Ramos, aucune différence significative n'a été constatée dans les pourcentages de lyse spécifique mesurés dans ces expériences, et ceux pour les quatre lignées hématopoïétiques testées (Figure 40). Ceci montre que les lymphocytes T V γ 9V δ 2 induits par l'IL-33 possèdent un réel potentiel cytotoxique antitumoral, comparable à celui des lymphocytes T V γ 9V δ 2 induits par l'IL-2.

L'IL-33 n'est pas toxique pour les PBMC humaines cultivées *in vitro*

Pour envisager d'utiliser l'IL-33 en remplacement de l'IL2 dans les immunothérapies anticancéreuses basées sur les lymphocytes T V γ 9V δ 2, il faut que cette cytokine réponde à deux critères. D'une part, elle doit posséder le même potentiel inducteur concernant l'amplification et les fonctions anticancéreuses des lymphocytes T V γ 9V δ 2. L'article 1 et les

résultats complémentaires présentés ci-dessus adressent cette question. D'autre part, l'IL-33 ne doit pas être toxique pour les patients. Jusqu'à présent, notre étude ne contient pas d'expérimentation en modèle pré-clinique *in vivo*. Cependant, nous avons tout de même évalué la toxicité de l'IL-33 sur nos cultures cellulaires *in vitro*. Pour cela, nous avons mesuré la viabilité cellulaire des cellules issues de lignées IL-33 $\gamma\delta$ -pcl ou de lignées IL-2 $\gamma\delta$ -pcl au bout de 9 jours de culture.

Méthodologie :

La viabilité cellulaire dans les cultures est obtenue à l'aide du compteur de cellules automatisé ADAM. Deux échantillons homogènes de cellules ont été récoltés dans les cultures de lignées IL-33 $\gamma\delta$ -pcl induites avec 100, 500 ou 1000 ng/ml d'IL-33 ou de lignées IL-2 $\gamma\delta$ -pcl. Sur un des échantillons, une solution de lyse contenant de l'iodure de propidium est appliquée, ce qui donne le nombre total de cellules dans la culture. Une solution non lysante avec de l'iodure de propidium est appliquée sur le deuxième échantillon et fournit le nombre de cellules mortes dans la culture. Le pourcentage de cellules vivantes dans la culture est obtenue avec la formule (nombre total de cellules - nombre de cellules mortes) / (nombre total de cellules) x 100.

Résultats :

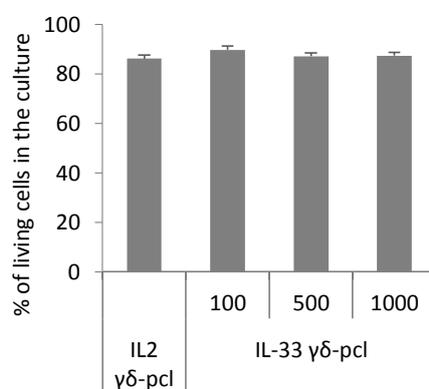


Figure 41 : L'IL-33 n'est pas toxique pour les cellules humaines du sang périphérique en culture *in vitro*. Pourcentages de cellules vivantes dans les cultures de lignées IL-33 $\gamma\delta$ -pcl induites avec 100, 500, ou 1000 ng/ml d'IL-33 ou de lignées IL-2 $\gamma\delta$ -pcl après 9 jours de culture. Les données représentent les moyennes + SEM pour $n=11$ expériences indépendantes.

Les lignées de lymphocytes T V γ 9V δ 2 induites avec de l'IL-33 aux trois doses utilisées ont toutes une *viabilité* supérieure à 80% après 9 jours de culture *in vitro*, identique à celle des lignées cellulaires induites avec de l'IL-2 (Figure 41). Ces données montrent que l'IL-33 n'est pas toxique pour les cellules humaines du sang périphérique, même à la plus forte dose utilisée.

Conclusion

Notre étude montre que l'IL-33 potentialise la prolifération des lymphocytes T V γ 9V δ 2 activés par un PAg. De plus, les lignées de lymphocytes T V γ 9V δ 2 induites avec de l'IL-33, au même titre que celles induites avec de l'IL-2, sécrètent des cytokines pro-inflammatoires IFN- γ et TNF- α et des granules lytiques. Au final, la combinaison BrHPP/IL-33 semble aussi efficace dans l'induction des fonctions anticancéreuses des lymphocytes T V γ 9V δ 2 que la combinaison BrHPP/IL-2, comme le montre nos expériences de cytotoxicité cellulaire dirigée contre les lignées tumorales.

En outre, cette étude soulève un point intéressant quant à la prolifération des lymphocytes T V γ 9V δ 2 en présence d'IL-33. En effet, nous avons mis en évidence un mécanisme complexe impliquant une dépendance aux lymphocytes T CD4 et à l'IL-2. Des travaux ultérieurs au niveau moléculaire devraient nous permettre d'élucider complètement ce mécanisme.

Enfin, bien que nous n'ayons pas réalisé d'étude préclinique en modèle *in vivo*, nos données montrent que l'IL-33 ne semble pas toxique sur les cellules humaines du sang périphérique *in vitro*, ce qui est un point important pour une utilisation éventuelle en immunothérapie chez les patients.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Le caractère non conventionnel des lymphocytes T V γ 9V δ 2 leur confère un grand potentiel pour les immunothérapies anticancéreuses. En effet, le fait qu'ils soient activés par les PAg produits par les cellules tumorales sans restriction par les molécules du CMH leur permet de s'affranchir de certains écueils de l'immuno-échappement des tumeurs comme la diminution de l'expression des Ags tumoraux ou du CMH de classe I par les cellules cancéreuses. Les essais cliniques de phase I et II menés à ce jour ont montré la faisabilité d'immunothérapies basées sur ces lymphocytes et certains ont montré des résultats encourageants²⁵⁴. Nonobstant ces avancées, l'utilisation des lymphocytes T V γ 9V δ 2 en thérapies doit encore dépasser certaines limitations, notamment en ce qui concerne la toxicité de l'IL-2 pour les patients.

L'IL-33 est une cytokine potentielle pour remplacer l'IL-2 dans ces thérapies. Cette cytokine a déjà montré des propriétés intéressantes comme adjuvant dans les vaccins thérapeutiques contre le cancer du col de l'utérus³⁶⁴. De plus, l'IL-33 est une alarmine naturellement présente dans le microenvironnement tumoral, exprimée dans les cellules cancéreuses³⁹²⁻³⁹⁴ et de manière constitutive dans les vaisseaux tumoraux²⁶¹. Elle partage aussi de nombreuses caractéristiques fonctionnelles avec HMGB1. Il n'est donc pas exclu qu'elle soit impliquée dans les mécanismes de mort immunogénique. Il serait alors intéressant d'étudier les conséquences de la libération massive d'IL-33 endogène dans des tumeurs traitées par des agents inducteurs de mort immunogénique comme le cyclophosphamide par exemple.

Mes travaux ont montré que l'utilisation d'IL-33 recombinante *in vitro* permet d'amplifier les lymphocytes T V γ 9V δ 2 activés par un PAg. Nous avons mis en évidence que ce mécanisme de prolifération est un mécanisme complexe. Pour proliférer en présence d'IL-33, les lymphocytes T V γ 9V δ 2 sont dépendants de la présence des lymphocytes T CD4 dans la culture. De plus, comme le montre les expériences réalisées avec des Ac bloquant l'IL-2 et le récepteur CD25, cette prolifération est liée à la présence d'IL-2 endogène dans la culture. Pourtant, les dosages ELISA que nous avons réalisés sur nos surnageants de culture n'ont pas révélé de corrélation entre la concentration d'IL-2 dans les surnageants et les doses croissantes d'IL-33 (données non montrées). Néanmoins, il est possible que l'IL-2 soit

consommée trop vite par les cellules pour que nous puissions la détecter correctement avec un dosage ELISA.

Les données de la littérature sont claires quant au fait que l'IL-33 active les lymphocytes Th2 mais pas les lymphocytes Th1^{260,321}. Pourtant, l'IL-5 et l'IL-13 classiquement produites par les lymphocytes Th2 ne sont pas connues pour induire la prolifération des lymphocytes T V γ 9V δ 2. D'autre part, l'IL-2 est une cytokine plutôt caractéristique des lymphocytes Th1. Nous pouvons également noter que les lymphocytes T V γ 9V δ 2 amplifiés par la combinaison PAg/IL-33 possèdent toutes les caractéristiques fonctionnelles des lymphocytes T V γ 9V δ 2 classiquement induits à l'IL-2 recombinante exogène et orientés vers un phénotype Th1. Il semble donc peu probable que des facteurs typiques des réponses immunitaires Th2 soient impliqués dans ce mécanisme.

Nous pouvons donc nous demander qui des lymphocytes T V γ 9V δ 2 ou des lymphocytes T CD4 sécrètent cette IL-2 ? Les lymphocytes T CD4 sont connus comme étant les principaux sécréteurs d'IL-2 dans les PBMC. Nous avons donc réalisé des marquages intracellulaires de l'IL-2 dans les lymphocytes T CD4 issus de culture de PBMC activées par du BrHPP et de l'IL-33. Nous avons aussi utilisé un système de capture pour piéger l'IL-2 sécrétée à la surface des lymphocytes T CD4 puis nous avons marqué l'IL-2 capturée extracellulaire. Aucune de ces deux méthodes n'a révélé l'expression ou la sécrétion d'IL-2 par les lymphocytes T CD4. Alors, il est possible que ce soit les lymphocytes T V γ 9V δ 2 qui produisent de l'IL-2 suite au contact avec les lymphocytes T CD4. L'IL-2 agirait ainsi de manière autocrine. Le groupe de Bruno Silva-Santos a montré que l'activation du récepteur de costimulation CD28 sur les lymphocytes T γ δ humains et murins, couplée à une stimulation anti-CD3, induit la sécrétion d'IL-2 par ces lymphocytes⁴⁰⁵. Cependant, que ce soit par des marquages intracellulaires ou *via* la capture extracellulaire, nous n'avons pas détecté d'expression d'IL-2 par les lymphocytes T V γ 9V δ 2 dans notre système de culture.

Le groupe de D. Kabelitz a montré que la prolifération des lymphocytes T V γ 9V δ 2 en réponse à *Mycobacterium tuberculosis* requière la présence des lymphocytes T CD4. Ces lymphocytes T CD4 Th1, activés par des APCs leur présentant les Ags de *M. tuberculosis*, produisent de l'IL-2 qui induit la prolifération des lymphocytes T V γ 9V δ 2⁴⁰⁶. Cependant, une

différence majeure existe entre cette étude et la notre. Dans leur système de culture, les lymphocytes T CD4 étaient activés par des APCs « chargées » avec des Ags tandis que nous observons la prolifération des lymphocytes T V γ 9V δ 2 dans un système de culture reconstitué avec uniquement des lymphocytes T CD4 et des lymphocytes T γ δ autologues. D'un autre côté, plusieurs études ont montré que les lymphocytes T γ δ peuvent réguler les fonctions des lymphocytes T CD4³¹. Dans ce cas, on peut envisager que la prolifération des lymphocytes T V γ 9V δ 2 dans notre système soit liée à une interdépendance entre les lymphocytes T CD4 et les lymphocytes T V γ 9V δ 2. Par exemple, il est possible que l'activation par le BrHPP induise l'expression d'une molécule de surface sur les lymphocytes T V γ 9V δ 2 qui va aider à l'activation des lymphocytes T CD4 stimulés par l'IL-33. En retour, ces lymphocytes T CD4 délivreraient un signal de costimulation qui induirait la production d'IL-2 par les lymphocytes T V γ 9V δ 2. Brandes et ses collaborateurs ont montré qu'en présence de PAg, les lymphocytes T V γ 9V δ 2 augmentent leur expression de molécules de costimulation CD80, CD86 et CD40⁶⁵. De plus, les lymphocytes T γ δ humains et murins activés expriment également la molécule CD40L^{407,408}. Il serait donc intéressant d'étudier quelle est l'implication de ces différentes molécules de costimulation dans ce mécanisme de prolifération.

Au-delà de la mise en évidence de ce mécanisme original, notre étude montre que les lymphocytes T V γ 9V δ 2 amplifiés à l'aide d'IL-33 et un PAg présentent toutes les fonctions antitumorales classiquement retrouvées chez ces cellules activées par des PAg et de l'IL-2. Mais pour envisager l'utilisation de l'IL-33 en thérapeutique, sa toxicité doit également être déterminée. Nos tests *in vitro* n'ont pas révélé de toxicité particulière sur les PBMC. *In vivo*, il est connu depuis la découverte de l'IL-33 en tant que ligand de ST2 que cette cytokine induit une splénomégalie et une éosinophilie chez les souris²⁶⁰. Son administration exogène n'est pas létale et son expression constitutive de manière transgénique a même montré une action anticancéreuse³⁶⁰. Le fait que l'IL-33 provoque une éosinophilie chez les souris pourrait être un avantage dans le traitement des cancers. En effet, les polynucléaires éosinophiles présentent aussi des fonctions anticancéreuses^{160,409}. Il faut également noter que les éosinophiles expriment un TCR V γ 9V δ 2 (parfois aussi V δ 1) complètement fonctionnel. Les éosinophiles qui expriment ce TCR γ δ peuvent être induits à sécréter des granules lytiques, des ROS et des cytokines pro-inflammatoires IFN- γ et TNF- α par des extraits

mycobactériens⁴¹⁰. Ainsi, l'utilisation de la combinaison BrHPP/IL-33 en thérapeutique pourrait avoir des effets bénéfiques inattendus au départ.

Aujourd'hui, il est nécessaire d'étendre notre étude pour passer de l'expérimentation *in vitro* à l'expérimentation *in vivo*. En effet, nous souhaitons établir l'intérêt thérapeutique de la combinaison PAg/IL-33 chez la souris. Pour cela, il est possible de réaliser des xénogreffes de tumeurs humaines chez des souris immunodéprimées (SCID beige ou NSG), puis de procéder à un transfert adoptif de PBMCs humaines couplé à des injections de PAg et d'IL-33. Ainsi, ce système permet d'évaluer l'impact de l'IL-33 en tant qu'agent immunothérapeutique dans une thérapie basée sur l'action spécifique des lymphocytes T V γ 9V δ 2. Si ces études précliniques donnent des résultats satisfaisants, nous pourrions envisager de confirmer ces résultats chez des primates non humains.

En conclusion, ces travaux de thèse représentent une première étape vers ce qui pourrait, à terme, devenir un nouveau protocole d'immunothérapie anticancéreuse. Ainsi, cette thèse illustre la démarche scientifique et la mise en œuvre des premières expérimentations nécessaires au développement de nouveaux protocoles d'immunothérapies appliquées à l'oncologie.

BIBLIOGRAPHIE

1. Fulda S, Debatin K. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*. 2006;25(34):4798-4811.
2. Dieli F, Poccia F, Lipp M, et al. Differentiation of effector/memory Vdelta2 T cells and migratory routes in lymph nodes or inflammatory sites. *J Exp Med*. 2003;198(3):391-397.
3. Caccamo N, Meraviglia S, Ferlazzo V, et al. Differential requirements for antigen or homeostatic cytokines for proliferation and differentiation of human Vgamma9Vdelta2 naive, memory and effector T cell subsets. *Eur J Immunol*. 2005;35(6):1764-1772.
4. Caccamo N, Battistini L, Bonneville M, et al. CXCR5 identifies a subset of Vgamma9Vdelta2 T cells which secrete IL-4 and IL-10 and help B cells for antibody production. *J Immunol*. 2006;177(8):5290-5295.
5. Angelini DF, Borsellino G, Poupot M, et al. FcgammaRIII discriminates between 2 subsets of Vgamma9Vdelta2 effector cells with different responses and activation pathways. *Blood*. 2004;104(6):1801-1807.
6. Wang H, Henry O, Distefano MD, et al. Butyrophilin 3A1 plays an essential role in prenyl pyrophosphate stimulation of human Vgamma2Vdelta2 T cells. *J Immunol*. 2013;191(3):1029-1042.
7. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology 6th edition (ed 6th). Philadelphia: Saunders Elsevier; 2010.
8. Coquerel G, Aubin E. Phosphoantigen salts of organic bases and methods for their crystallization. Vol. WO2007039635 A2. France: Innate Pharma; 2007.
9. Espinosa E. Activation et mode d'activation des lymphocytes T gamma delta humains par les phosphoantigènes. Immunology. Vol. PhD. Toulouse: University of Toulouse Paul Sabatier; 2002:127.
10. Kabelitz D. CD277 takes the lead in human gamma delta T-cell activation. *Blood*. 2012;120(11):2159-2161.
11. Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(1):11-22.
12. Cayrol C, Girard JP. IL-33: an alarmin cytokine with crucial roles in innate immunity, inflammation and allergy. *Curr Opin Immunol*. 2014;31C:31-37.
13. Swann JB, Smyth MJ. Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest*. 2007;117(5):1137-1146.
14. Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(4):279-289.
15. Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O, Zitvogel L. Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:51-72.
16. Imai K, Takaoka A. Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(9):714-727.
17. Kerkar SP, Restifo NP. Cellular constituents of immune escape within the tumor microenvironment. *Cancer Res*. 2012;72(13):3125-3130.
18. Campana L, Bosurgi L, Rovere-Querini P. HMGB1: a two-headed signal regulating tumor progression and immunity. *Curr Opin Immunol*. 2008;20(5):518-523.
19. Restifo NP, Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(4):269-281.
20. Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity*. 2013;39(6):1003-1018.
21. Vivier E, Ugolini S, Blaise D, Chabannon C, Brossay L. Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(4):239-252.
22. Swain SL, McKinstry KK, Strutt TM. Expanding roles for CD4+ T cells in immunity to viruses. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(2):136-148.
23. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol*. 2014;27:16-25.

24. Walker JA, Barlow JL, McKenzie AN. Innate lymphoid cells--how did we miss them? *Nat Rev Immunol*. 2013;13(2):75-87.
25. Scott AM, Wolchok JD, Old LJ. Antibody therapy of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):278-287.
26. Houot R, Kohrt HE, Marabelle A, Levy R. Targeting immune effector cells to promote antibody-induced cytotoxicity in cancer immunotherapy. *Trends Immunol*. 2011;32(11):510-516.
27. Martin MU. Special aspects of interleukin-33 and the IL-33 receptor complex. *Semin Immunol*. 2013;25(6):449-457.
28. Caccamo N, Dieli F, Meraviglia S, Guggino G, Salerno A. Gammadelta T cell modulation in anticancer treatment. *Curr Cancer Drug Targets*. 2010;10(1):27-36.
29. Thedrez A, Sabourin C, Gertner J, et al. Self/non-self discrimination by human gammadelta T cells: simple solutions for a complex issue? *Immunol Rev*. 2007;215:123-135.
30. Chan JK, Roth J, Oppenheim JJ, et al. Alarmins: awaiting a clinical response. *J Clin Invest*. 2012;122(8):2711-2719.
31. Bonneville M, O'Brien RL, Born WK. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(7):467-478.
32. Liu X, Hammel M, He Y, et al. Structural insights into the interaction of IL-33 with its receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(37):14918-14923.
33. Catros V, Toutirais O, Bouet F, Cabillic F, Desille M, Fournié JJ. [Tgammadelta lymphocytes in oncology: unconventional killer lymphocytes]. *Med Sci (Paris)*. 2010;26(2):185-191.
34. Voskoboinik I, Smyth M, Trapani J. Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. *Nature Reviews Immunology*. 2006;6(12):940-952.
35. Carding SR, Egan PJ. Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(5):336-345.
36. Rochman Y, Spolski R, Leonard WJ. New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(7):480-490.
37. Lanzavecchia A, Sallusto F. The instructive role of dendritic cells on T cell responses: lineages, plasticity and kinetics. *Curr Opin Immunol*. 2001;13(3):291-298.
38. Harsini S, Beigy M, Akhavan-Sabbagh M, Rezaei N. Toll-like receptors in lymphoid malignancies: double-edged sword. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2014;89(2):262-283.
39. Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Kroemer G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(1):59-73.
40. Banchereau J, Briere F, Caux C, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:767-811.
41. Randolph GJ, Angeli V, Swartz MA. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(8):617-628.
42. Fujii S, Liu K, Smith C, Bonito AJ, Steinman RM. The linkage of innate to adaptive immunity via maturing dendritic cells in vivo requires CD40 ligation in addition to antigen presentation and CD80/86 costimulation. *J Exp Med*. 2004;199(12):1607-1618.
43. Ivarsson MA, Michaëlsson J, Fauriat C. Activating killer cell Ig-like receptors in health and disease. *Front Immunol*. 2014;5:184.
44. Raulet DH, Gasser S, Gowen BG, Deng W, Jung H. Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:413-441.
45. Cassidy SA, Cheent KS, Khakoo SI. Effects of Peptide on NK cell-mediated MHC I recognition. *Front Immunol*. 2014;5:133.
46. Kruse PH, Matta J, Ugolini S, Vivier E. Natural cytotoxicity receptors and their ligands. *Immunol Cell Biol*. 2014;92(3):221-229.
47. Smyth MJ, Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H. New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(11):850-861.
48. Moretta L, Montaldo E, Vacca P, et al. Human natural killer cells: origin, receptors, function, and clinical applications. *Int Arch Allergy Immunol*. 2014;164(4):253-264.

49. Cartron G, Watier H, Golay J, Solal-Celigny P. From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy. *Blood*. 2004;104(9):2635-2642.
50. Raphael I, Nalawade S, Eagar TN, Forsthuber TG. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine*. 2014.
51. Martorelli D, Muraro E, Merlo A, Turrini R, Rosato A, Dolcetti R. Role of CD4+ cytotoxic T lymphocytes in the control of viral diseases and cancer. *Int Rev Immunol*. 2010;29(4):371-402.
52. Akhmetzyanova I, Zelinsky G, Schimmer S, et al. Tumor-specific CD4+ T cells develop cytotoxic activity and eliminate virus-induced tumor cells in the absence of regulatory T cells. *Cancer Immunol Immunother*. 2013;62(2):257-271.
53. Tiriveedhi V, Fleming TP, Goedegebuure PS, et al. Mammaglobin-A cDNA vaccination of breast cancer patients induces antigen-specific cytotoxic CD4+ICOShi T cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;138(1):109-118.
54. Péguillet I, Milder M, Louis D, et al. High numbers of differentiated effector CD4 T cells are found in patients with cancer and correlate with clinical response after neoadjuvant therapy of breast cancer. *Cancer Res*. 2014;74(8):2204-2216.
55. Fu J, Zhang Z, Zhou L, et al. Impairment of CD4+ cytotoxic T cells predicts poor survival and high recurrence rates in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2013;58(1):139-149.
56. Weigel B, Krause M, Friedl P. Cytotoxic T lymphocyte migration and effector function in the tumor microenvironment. *Immunol Lett*. 2011;138(1):19-21.
57. Kennedy R, Celis E. Multiple roles for CD4+ T cells in anti-tumor immune responses. *Immunol Rev*. 2008;222:129-144.
58. Janssen EM, Lemmens EE, Wolfe T, Christen U, von Herrath MG, Schoenberger SP. CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature*. 2003;421(6925):852-856.
59. Shedlock DJ, Shen H. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science*. 2003;300(5617):337-339.
60. Carding SR, McNamara JG, Pan M, Bottomly K. Characterization of gamma/delta T cell clones isolated from human fetal liver and thymus. *Eur J Immunol*. 1990;20(6):1327-1335.
61. McVay LD, Carding SR. Extrathymic origin of human gamma delta T cells during fetal development. *J Immunol*. 1996;157(7):2873-2882.
62. Morita CT, Beckman EM, Bukowski JF, et al. Direct presentation of nonpeptide prenyl pyrophosphate antigens to human gamma delta T cells. *Immunity*. 1995;3(4):495-507.
63. Vantourout P, Hayday A. Six-of-the-best: unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(2):88-100.
64. Hayday AC. Gammadelta T cells and the lymphoid stress-surveillance response. *Immunity*. 2009;31(2):184-196.
65. Brandes M, Willimann K, Moser B. Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells. *Science*. 2005;309(5732):264-268.
66. Brandes M, Willimann K, Bioley G, et al. Cross-presenting human gammadelta T cells induce robust CD8+ alpha beta T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(7):2307-2312.
67. Meuter S, Eberl M, Moser B. Prolonged antigen survival and cytosolic export in cross-presenting human gammadelta T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(19):8730-8735.
68. Himoudi N, Morgenstern DA, Yan M, et al. Human $\gamma\delta$ T lymphocytes are licensed for professional antigen presentation by interaction with opsonized target cells. *J Immunol*. 2012;188(4):1708-1716.
69. Kang N, Tang L, Li X, et al. Identification and characterization of Foxp3(+) gammadelta T cells in mouse and human. *Immunol Lett*. 2009;125(2):105-113.
70. Hua F, Kang N, Gao YA, Cui LX, Ba DN, He W. Potential regulatory role of in vitro-expanded V δ 1 T cells from human peripheral blood. *Immunol Res*. 2013;56(1):172-180.

71. Casetti R, Agrati C, Wallace M, et al. Cutting edge: TGF-beta1 and IL-15 Induce FOXP3+ gammadelta regulatory T cells in the presence of antigen stimulation. *J Immunol.* 2009;183(6):3574-3577.
72. Kühl AA, Pawlowski NN, Grollich K, et al. Human peripheral gammadelta T cells possess regulatory potential. *Immunology.* 2009;128(4):580-588.
73. Peters C, Oberg HH, Kabelitz D, Wesch D. Phenotype and regulation of immunosuppressive Vδ2-expressing γδ T cells. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(10):1943-1960.
74. Cua DJ, Tato CM. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(7):479-489.
75. Murugaiyan G, Saha B. Protumor vs Antitumor Functions of IL-17. *The Journal of Immunology.* 2009.
76. Benchetrit F, Ciree A, Vives V, et al. Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell-dependent mechanism. *Blood.* 2002;99(6):2114-2121.
77. Hirahara N, Nio Y, Sasaki S, et al. Inoculation of human interleukin-17 gene-transfected Meth-A fibrosarcoma cells induces T cell-dependent tumor-specific immunity in mice. *Oncology.* 2001;61(1):79-89.
78. Takahashi H, Numasaki M, Lotze MT, Sasaki H. Interleukin-17 enhances bFGF-, HGF- and VEGF-induced growth of vascular endothelial cells. *Immunol Lett.* 2005;98(2):189-193.
79. Jeon SH, Chae BC, Kim HA, et al. Mechanisms underlying TGF-beta1-induced expression of VEGF and Flk-1 in mouse macrophages and their implications for angiogenesis. *J Leukoc Biol.* 2007;81(2):557-566.
80. Huang X, Lee C. Regulation of stromal proliferation, growth arrest, differentiation and apoptosis in benign prostatic hyperplasia by TGF-beta. *Front Biosci.* 2003;8:s740-749.
81. Kehlen A, Thiele K, Riemann D, Rainov N, Langner J. Interleukin-17 stimulates the expression of IkappaB alpha mRNA and the secretion of IL-6 and IL-8 in glioblastoma cell lines. *J Neuroimmunol.* 1999;101(1):1-6.
82. Numasaki M, Watanabe M, Suzuki T, et al. IL-17 enhances the net angiogenic activity and in vivo growth of human non-small cell lung cancer in SCID mice through promoting CXCR-2-dependent angiogenesis. *J Immunol.* 2005;175(9):6177-6189.
83. Wakita D, Sumida K, Iwakura Y, et al. Tumor-infiltrating IL-17-producing gammadelta T cells support the progression of tumor by promoting angiogenesis. *Eur J Immunol.* 2010;40(7):1927-1937.
84. Carmi Y, Rinott G, Dotan S, et al. Microenvironment-derived IL-1 and IL-17 interact in the control of lung metastasis. *J Immunol.* 2011;186(6):3462-3471.
85. Ma S, Cheng Q, Cai Y, et al. IL-17A produced by γδ T cells promotes tumor growth in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2014;74(7):1969-1982.
86. Rei M, Gonçalves-Sousa N, Lança T, et al. Murine CD27(-) Vγ6(+) γδ T cells producing IL-17A promote ovarian cancer growth via mobilization of protumor small peritoneal macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014.
87. Wu P, Wu D, Ni C, et al. γδT17 cells promote the accumulation and expansion of myeloid-derived suppressor cells in human colorectal cancer. *Immunity.* 2014;40(5):785-800.
88. Ma Y, Aymeric L, Locher C, et al. Contribution of IL-17-producing gamma delta T cells to the efficacy of anticancer chemotherapy. *J Exp Med.* 2011;208(3):491-503.
89. Takeuchi A, Dejima T, Yamada H, et al. IL-17 production by γδ T cells is important for the antitumor effect of Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin treatment against bladder cancer. *Eur J Immunol.* 2011;41(1):246-251.
90. Holoshitz J, Koning F, Coligan JE, De Bruyn J, Strober S. Isolation of CD4- CD8- mycobacteria-reactive T lymphocyte clones from rheumatoid arthritis synovial fluid. *Nature.* 1989;339(6221):226-229.

91. Haregewoin A, Soman G, Hom RC, Finberg RW. Human gamma delta+ T cells respond to mycobacterial heat-shock protein. *Nature*. 1989;340(6231):309-312.
92. Fisch P, Malkovsky M, Kovats S, et al. Recognition by human V gamma 9/V delta 2 T cells of a GroEL homolog on Daudi Burkitt's lymphoma cells. *Science*. 1990;250(4985):1269-1273.
93. Constant P, Davodeau F, Peyrat MA, et al. Stimulation of human gamma delta T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Science*. 1994;264(5156):267-270.
94. Nedellec S, Bonneville M, Scotet E. Human Vgamma9Vdelta2 T cells: from signals to functions. *Semin Immunol*. 2010;22(4):199-206.
95. Belmant C, Decise D, Fournié J. Phosphoantigens and aminobisphosphonates: New leads targeting $\gamma\delta$ T lymphocytes for cancer immunotherapy. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*. 2006;3(1):17-23.
96. Viey E, Fromont G, Escudier B, et al. Phosphostim-activated gamma delta T cells kill autologous metastatic renal cell carcinoma. *J Immunol*. 2005;174(3):1338-1347.
97. Poupot M, Fournie JJ. Non-peptide antigens activating human Vgamma9/Vdelta2 T lymphocytes. *Immunol Lett*. 2004;95(2):129-138.
98. Gober HJ, Kistowska M, Angman L, Jeno P, Mori L, De Libero G. Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J Exp Med*. 2003;197(2):163-168.
99. Lang F, Peyrat MA, Constant P, et al. Early activation of human V gamma 9V delta 2 T cell broad cytotoxicity and TNF production by nonpeptidic mycobacterial ligands. *J Immunol*. 1995;154(11):5986-5994.
100. Fisch P, Malkovsky M, Braakman E, et al. Gamma/delta T cell clones and natural killer cell clones mediate distinct patterns of non-major histocompatibility complex-restricted cytolysis. *J Exp Med*. 1990;171(5):1567-1579.
101. Martinet L, Fleury-Cappellesso S, Gadelorge M, et al. A regulatory cross-talk between Vgamma9Vdelta2 T lymphocytes and mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol*. 2009;39(3):752-762.
102. Scotet E, Martinez LO, Grant E, et al. Tumor recognition following Vgamma9Vdelta2 T cell receptor interactions with a surface F1-ATPase-related structure and apolipoprotein A-I. *Immunity*. 2005;22(1):71-80.
103. Mookerjee-Basu J, Vantourout P, Martinez LO, et al. F1-adenosine triphosphatase displays properties characteristic of an antigen presentation molecule for Vgamma9Vdelta2 T cells. *J Immunol*. 2010;184(12):6920-6928.
104. Harly C, Guillaume Y, Nedellec S, et al. Key implication of CD277/butyrophilin-3 (BTN3A) in cellular stress sensing by a major human $\gamma\delta$ T-cell subset. *Blood*. 2012;120(11):2269-2279.
105. Arnett HA, Viney JL. Immune modulation by butyrophilins. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(8):559-569.
106. Boyden LM, Lewis JM, Barbee SD, et al. Skint1, the prototype of a newly identified immunoglobulin superfamily gene cluster, positively selects epidermal gammadelta T cells. *Nat Genet*. 2008;40(5):656-662.
107. Turchinovich G, Hayday AC. Skint-1 identifies a common molecular mechanism for the development of interferon- γ -secreting versus interleukin-17-secreting $\gamma\delta$ T cells. *Immunity*. 2011;35(1):59-68.
108. Compte E, Pontarotti P, Collette Y, Lopez M, Olive D. Frontline: Characterization of BT3 molecules belonging to the B7 family expressed on immune cells. *Eur J Immunol*. 2004;34(8):2089-2099.
109. Palakodeti A, Sandstrom A, Sundaresan L, et al. The molecular basis for modulation of human V γ 9V δ 2 T cell responses by CD277/butyrophilin-3 (BTN3A)-specific antibodies. *J Biol Chem*. 2012;287(39):32780-32790.

110. Vavassori S, Kumar A, Wan GS, et al. Butyrophilin 3A1 binds phosphorylated antigens and stimulates human $\gamma\delta$ T cells. *Nat Immunol*. 2013;14(9):908-916.
111. Kabelitz D. Critical role of butyrophilin 3A1 in presenting prenyl pyrophosphate antigens to human $\gamma\delta$ T cells. *Cellular and Molecular Immunology*. 2014;11(2):117-119.
112. Sandstrom A, Peigné CM, Léger A, et al. The intracellular B30.2 domain of butyrophilin 3A1 binds phosphoantigens to mediate activation of human V γ 9V δ 2 T cells. *Immunity*. 2014;40(4):490-500.
113. Bukowski JF, Morita CT, Brenner MB. Human gamma delta T cells recognize alkylamines derived from microbes, edible plants, and tea: implications for innate immunity. *Immunity*. 1999;11(1):57-65.
114. Kunzmann V, Bauer E, Feurle J, Weissinger F, Tony HP, Wilhelm M. Stimulation of gammadelta T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma. *Blood*. 2000;96(2):384-392.
115. Rubio G, Aramburu J, Ontanon J, Lopez-Botet M, Aparicio P. A novel functional cell surface dimer (kp43) serves as accessory molecule for the activation of a subset of human gamma delta T cells. *J Immunol*. 1993;151(3):1312-1321.
116. Das H, Groh V, Kuijl C, et al. MICA engagement by human Vgamma2Vdelta2 T cells enhances their antigen-dependent effector function. *Immunity*. 2001;15(1):83-93.
117. Favier B, Espinosa E, Tabiasco J, et al. Uncoupling between immunological synapse formation and functional outcome in human gamma delta T lymphocytes. *J Immunol*. 2003;171(10):5027-5033.
118. Corvaisier M, Moreau-Aubry A, Diez E, et al. V gamma 9V delta 2 T cell response to colon carcinoma cells. *J Immunol*. 2005;175(8):5481-5488.
119. Poccia F, Cipriani B, Vendetti S, et al. CD94/NKG2 inhibitory receptor complex modulates both anti-viral and anti-tumoral responses of polyclonal phosphoantigen-reactive V gamma 9V delta 2 T lymphocytes. *J Immunol*. 1997;159(12):6009-6017.
120. Angelini DF, Zambello R, Galandrini R, et al. NKG2A inhibits NKG2C effector functions of gammadelta T cells: implications in health and disease. *J Leukoc Biol*. 2011;89(1):75-84.
121. Boullier S, Poquet Y, Halary F, Bonneville M, Fournie JJ, Gougeon ML. Phosphoantigen activation induces surface translocation of intracellular CD94/NKG2A class I receptor on CD94- peripheral Vgamma9 Vdelta2 T cells but not on CD94- thymic or mature gammadelta T cell clones. *Eur J Immunol*. 1998;28(11):3399-3410.
122. Lesport E, Baudhuin J, Sousa S, et al. Inhibition of human gamma delta [corrected] T-cell antitumoral activity through HLA-G: implications for immunotherapy of cancer. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68(20):3385-3399.
123. Sicard H, Ingoure S, Luciani B, et al. In vivo immunomanipulation of V gamma 9V delta 2 T cells with a synthetic phosphoantigen in a preclinical nonhuman primate model. *J Immunol*. 2005;175(8):5471-5480.
124. Thedrez A, Harly C, Morice A, Salot S, Bonneville M, Scotet E. IL-21-mediated potentiation of antitumor cytolytic and proinflammatory responses of human V gamma 9V delta 2 T cells for adoptive immunotherapy. *J Immunol*. 2009;182(6):3423-3431.
125. Vermijlen D, Ellis P, Langford C, et al. Distinct cytokine-driven responses of activated blood gammadelta T cells: insights into unconventional T cell pleiotropy. *J Immunol*. 2007;178(7):4304-4314.
126. Beetz S, Wesch D, Marischen L, Welte S, Oberg HH, Kabelitz D. Innate immune functions of human gammadelta T cells. *Immunobiology*. 2008;213(3-4):173-182.
127. Kariko K, Ni H, Capodici J, Lamphier M, Weissman D. mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *J Biol Chem*. 2004;279(13):12542-12550.
128. Pietschmann K, Beetz S, Welte S, et al. Toll-like receptor expression and function in subsets of human gammadelta T lymphocytes. *Scand J Immunol*. 2009;70(3):245-255.

129. Deetz CO, Hebbeler AM, Propp NA, Cairo C, Tikhonov I, Pauza CD. Gamma interferon secretion by human Vgamma2Vdelta2 T cells after stimulation with antibody against the T-cell receptor plus the Toll-Like receptor 2 agonist Pam3Cys. *Infect Immun*. 2006;74(8):4505-4511.
130. Lafont V, Liautard J, Liautard JP, Favero J. Production of TNF-alpha by human V gamma 9V delta 2 T cells via engagement of Fc gamma RIIIA, the low affinity type 3 receptor for the Fc portion of IgG, expressed upon TCR activation by nonpeptidic antigen. *J Immunol*. 2001;166(12):7190-7199.
131. Kato Y, Tanaka Y, Tanaka H, Yamashita S, Minato N. Requirement of species-specific interactions for the activation of human gamma delta T cells by pamidronate. *J Immunol*. 2003;170(7):3608-3613.
132. Wang P, Malkovsky M. Different roles of the CD2 and LFA-1 T-cell co-receptors for regulating cytotoxic, proliferative, and cytokine responses of human V gamma 9/V delta 2 T cells. *Mol Med*. 2000;6(3):196-207.
133. Kato Y, Tanaka Y, Hayashi M, Okawa K, Minato N. Involvement of CD166 in the activation of human gamma delta T cells by tumor cells sensitized with nonpeptide antigens. *J Immunol*. 2006;177(2):877-884.
134. Bank I, Book M, Huszar M, Baram Y, Schnirer I, Brenner H. V delta 2+ gamma delta T lymphocytes are cytotoxic to the MCF 7 breast carcinoma cell line and can be detected among the T cells that infiltrate breast tumors. *Clin Immunol Immunopathol*. 1993;67(1):17-24.
135. Fisch P, Meuer E, Pende D, et al. Control of B cell lymphoma recognition via natural killer inhibitory receptors implies a role for human Vgamma9/Vdelta2 T cells in tumor immunity. *Eur J Immunol*. 1997;27(12):3368-3379.
136. Malkovska V, Cigel FK, Armstrong N, Storer BE, Hong R. Antilymphoma activity of human gamma delta T-cells in mice with severe combined immune deficiency. *Cancer Res*. 1992;52(20):5610-5616.
137. Choudhary A, Davodeau F, Moreau A, Peyrat MA, Bonneville M, Jotereau F. Selective lysis of autologous tumor cells by recurrent gamma delta tumor-infiltrating lymphocytes from renal carcinoma. *J Immunol*. 1995;154(8):3932-3940.
138. Liu Z, Guo BL, Gehrs BC, Nan L, Lopez RD. Ex vivo expanded human Vgamma9Vdelta2+ gammadelta-T cells mediate innate antitumor activity against human prostate cancer cells in vitro. *J Urol*. 2005;173(5):1552-1556.
139. Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2002;13(2):95-109.
140. Gao Y, Yang W, Pan M, et al. Gamma delta T cells provide an early source of interferon gamma in tumor immunity. *J Exp Med*. 2003;198(3):433-442.
141. Kaganoi J, Watanabe G, Okabe M, et al. STAT1 activation-induced apoptosis of esophageal squamous cell carcinoma cells in vivo. *Annals of Surgical Oncology*. 2007;14(4):1405-1415.
142. Yang G, Xu Y, Chen X, Hu G. IFITM1 plays an essential role in the antiproliferative action of interferon-gamma. *Oncogene*. 2007;26(4):594-603.
143. Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H, et al. IFN-gamma-mediated inhibition of tumor angiogenesis by natural killer T-cell ligand, alpha-galactosylceramide. *Blood*. 2002;100(5):1728-1733.
144. Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(11):836-848.
145. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(9):745-756.
146. Sayers TJ, Brooks AD, Ward JM, et al. The restricted expression of granzyme M in human lymphocytes. *J Immunol*. 2001;166(2):765-771.
147. Dieli F, Troye-Blomberg M, Ivanyi J, et al. Granulysin-dependent killing of intracellular and extracellular Mycobacterium tuberculosis by Vgamma9/Vdelta2 T lymphocytes. *J Infect Dis*. 2001;184(8):1082-1085.

148. Caccamo N, La Mendola C, Orlando V, et al. Differentiation, phenotype, and function of interleukin-17-producing human V γ 9V δ 2 T cells. *Blood*. 2011;118(1):129-138.
149. Li B, Bassiri H, Rossman MD, et al. Involvement of the Fas/Fas ligand pathway in activation-induced cell death of mycobacteria-reactive human gamma delta T cells: a mechanism for the loss of gamma delta T cells in patients with pulmonary tuberculosis. *J Immunol*. 1998;161(3):1558-1567.
150. Li Z, Peng H, Xu Q, Ye Z. Sensitization of human osteosarcoma cells to V γ 9V δ 2 T-cell-mediated cytotoxicity by zoledronate. *J Orthop Res*. 2012;30(5):824-830.
151. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
152. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674.
153. Iannello A, Raulet DH. Immune surveillance of unhealthy cells by natural killer cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2013;78:249-257.
154. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*. 2004;21(2):137-148.
155. Groh V, Li YQ, Cioca D, et al. Efficient cross-priming of tumor antigen-specific T cells by dendritic cells sensitized with diverse anti-MICA opsonized tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(18):6461-6466.
156. Lakshmi Narendra B, Eshvendar Reddy K, Shantikumar S, Ramakrishna S. Immune system: a double-edged sword in cancer. *Inflamm Res*. 2013;62(9):823-834.
157. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(10):715-727.
158. Smyth MJ, Dunn GP, Schreiber RD. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol*. 2006;90:1-50.
159. Galdiero MR, Bonavita E, Barajon I, Garlanda C, Mantovani A, Jaillon S. Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer. *Immunobiology*. 2013;218(11):1402-1410.
160. Gatault S, Legrand F, Delbeke M, Loiseau S, Capron M. Involvement of eosinophils in the anti-tumor response. *Cancer Immunol Immunother*. 2012;61(9):1527-1534.
161. Tecchio C, Scapini P, Pizzolo G, Cassatella MA. On the cytokines produced by human neutrophils in tumors. *Semin Cancer Biol*. 2013;23(3):159-170.
162. Burkholder B, Huang RY, Burgess R, et al. Tumor-induced perturbations of cytokines and immune cell networks. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1845(2):182-201.
163. Campbell DJ, Koch MA. Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(2):119-130.
164. Schoenberger SP, Toes RE, van der Voort EI, Offringa R, Melief CJ. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature*. 1998;393(6684):480-483.
165. Klein U, Dalla-Favera R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(1):22-33.
166. Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature*. 2007;449(7161):419-426.
167. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 2002;3(11):991-998.
168. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011;331(6024):1565-1570.
169. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, et al. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*. 2001;410(6832):1107-1111.
170. Wu X, Peng M, Huang B, et al. Immune microenvironment profiles of tumor immune equilibrium and immune escape states of mouse sarcoma. *Cancer Lett*. 2013;340(1):124-133.
171. Teng MW, Vesely MD, Duret H, et al. Opposing roles for IL-23 and IL-12 in maintaining occult cancer in an equilibrium state. *Cancer Res*. 2012;72(16):3987-3996.

172. Matsushita H, Vesely MD, Koboldt DC, et al. Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoediting. *Nature*. 2012;482(7385):400-404.
173. von Boehmer L, Mattle M, Bode P, et al. NY-ESO-1-specific immunological pressure and escape in a patient with metastatic melanoma. *Cancer Immun*. 2013;13:12.
174. Yamada N, Yamanegi K, Ohyama H, et al. Hypoxia downregulates the expression of cell surface MICA without increasing soluble MICA in osteosarcoma cells in a HIF-1 α -dependent manner. *Int J Oncol*. 2012;41(6):2005-2012.
175. Wu J, Zhang XJ, Shi KQ, et al. Hepatitis B surface antigen inhibits MICA and MICB expression via induction of cellular miRNAs in hepatocellular carcinoma cells. *Carcinogenesis*. 2014;35(1):155-163.
176. Shin MS, Kim HS, Lee SH, et al. Mutations of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1) and receptor 2 (TRAIL-R2) genes in metastatic breast cancers. *Cancer Res*. 2001;61(13):4942-4946.
177. Maeda T, Nakayama S, Yamada Y, et al. The conformational alteration of the mutated extracellular domain of Fas in an adult T cell leukemia cell line. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;296(5):1251-1256.
178. Bagnoli M, Canevari S, Mezzanzanica D. Cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) signalling: a key regulator of receptor-mediated apoptosis in physiologic context and in cancer. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010;42(2):210-213.
179. Ailawadhi S, Miecznikowski J, Gaile DP, et al. Bortezomib mitigates adverse prognosis conferred by Bcl-2 overexpression in patients with relapsed/refractory multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*. 2012;53(6):1174-1182.
180. Stella J, Bavaresco L, Braganhol E, et al. Differential ectonucleotidase expression in human bladder cancer cell lines. *Urol Oncol*. 2010;28(3):260-267.
181. Aliagas E, Vidal A, Texidó L, Ponce J, Condom E, Martín-Satué M. High expression of ectonucleotidases CD39 and CD73 in human endometrial tumors. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:509027.
182. Zhang L, Gajewski TF, Kline J. PD-1/PD-L1 interactions inhibit antitumor immune responses in a murine acute myeloid leukemia model. *Blood*. 2009;114(8):1545-1552.
183. Yang W, Chen PW, Li H, Alizadeh H, Niederkorn JY. PD-L1: PD-1 interaction contributes to the functional suppression of T-cell responses to human uveal melanoma cells in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(6):2518-2525.
184. Soliman H, Khalil F, Antonia S. PD-L1 expression is increased in a subset of basal type breast cancer cells. *PLoS One*. 2014;9(2):e88557.
185. Capietto AH, Martinet L, Fournié JJ. How tumors might withstand $\gamma\delta$ T-cell attack. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68(14):2433-2442.
186. Dolusić E, Larrieu P, Moineaux L, et al. Tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO) inhibitors. 3-(2-(pyridyl)ethenyl)indoles as potential anticancer immunomodulators. *J Med Chem*. 2011;54(15):5320-5334.
187. Giordano M, Croci DO, Rabinovich GA. Galectins in hematological malignancies. *Curr Opin Hematol*. 2013;20(4):327-335.
188. Motz GT, Coukos G. The parallel lives of angiogenesis and immunosuppression: cancer and other tales. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(10):702-711.
189. Brennen WN, Isaacs JT, Denmeade SR. Rationale behind targeting fibroblast activation protein-expressing carcinoma-associated fibroblasts as a novel chemotherapeutic strategy. *Mol Cancer Ther*. 2012;11(2):257-266.
190. Tai X, Van Laethem F, Pobeziński L, et al. Basis of CTLA-4 function in regulatory and conventional CD4(+) T cells. *Blood*. 2012;119(22):5155-5163.
191. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(3):162-174.

192. Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC, Morgan RA, Dudley ME. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(4):299-308.
193. Riether C, Schürch C, Ochsenbein AF. From "magic bullets" to specific cancer immunotherapy. *Swiss Med Wkly*. 2013;143:w13734.
194. Sliwkowski MX, Mellman I. Antibody therapeutics in cancer. *Science*. 2013;341(6151):1192-1198.
195. Robert C, Ghiringhelli F. What is the role of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma? *Oncologist*. 2009;14(8):848-861.
196. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2010;363(8):711-723.
197. Transparence Cdl. Avis sur la spécialité médicale YERVOY 5 mg/ml, solution à diluer pour perfusion, laboratoires BMS.: Haute Autorité de Santé; 2011.
198. Kirkwood JM, Butterfield LH, Tarhini AA, Zarour H, Kalinski P, Ferrone S. Immunotherapy of cancer in 2012. *CA Cancer J Clin*. 2012;62(5):309-335.
199. Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(19):12293-12297.
200. Chen DS, Irving BA, Hodi FS. Molecular pathways: next-generation immunotherapy--inhibiting programmed death-ligand 1 and programmed death-1. *Clin Cancer Res*. 2012;18(24):6580-6587.
201. Gunturi A, McDermott DF. Nivolumab for the treatment of cancer. *Expert Opin Investig Drugs*. 2014:1-8.
202. ANSM. ATU de cohorte pour le PEMBROLIZUMAB MSD FRANCE 50 mg, poudre pour solution pour perfusion; 2014.
203. Suntharalingam G, Perry MR, Ward S, et al. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med*. 2006;355(10):1018-1028.
204. Goldenberg DM, Sharkey RM. Using antibodies to target cancer therapeutics. *Expert Opin Biol Ther*. 2012;12(9):1173-1190.
205. Johnson LA, Morgan RA, Dudley ME, et al. Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood*. 2009;114(3):535-546.
206. Liu JK. Anti-Cancer Vaccines - A One-Hit Wonder? *Yale J Biol Med*. 2014;87(4):481-489.
207. Buonaguro L, Petrizzo A, Tornesello ML, Buonaguro FM. Translating tumor antigens into cancer vaccines. *Clin Vaccine Immunol*. 2011;18(1):23-34.
208. Vidal. Monographie du GARDASIL susp inj ser; 2014.
209. Cheever MA, Higano CS. PROVENGE (Sipuleucel-T) in prostate cancer: the first FDA-approved therapeutic cancer vaccine. *Clin Cancer Res*. 2011;17(11):3520-3526.
210. Radford KJ, Tullett KM, Lahoud MH. Dendritic cells and cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol*. 2014;27:26-32.
211. Yoshimoto T, Morishima N, Okumura M, Chiba Y, Xu M, Mizuguchi J. Interleukins and cancer immunotherapy. *Immunotherapy*. 2009;1(5):825-844.
212. Rizza P, Moretti F, Belardelli F. Recent advances on the immunomodulatory effects of IFN-alpha: implications for cancer immunotherapy and autoimmunity. *Autoimmunity*. 2010;43(3):204-209.
213. Belardelli F, Gresser I. The neglected role of type I interferon in the T-cell response: implications for its clinical use. *Immunol Today*. 1996;17(8):369-372.
214. Belardelli F, Ferrantini M, Proietti E, Kirkwood JM. Interferon-alpha in tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2002;13(2):119-134.
215. Tough DF, Borrow P, Sprent J. Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo. *Science*. 1996;272(5270):1947-1950.

216. Di Pucchio T, Pilla L, Capone I, et al. Immunization of stage IV melanoma patients with Melan-A/MART-1 and gp100 peptides plus IFN-alpha results in the activation of specific CD8(+) T cells and monocyte/dendritic cell precursors. *Cancer Res.* 2006;66(9):4943-4951.
217. Rosenberg SA. IL-2: the first effective immunotherapy for human cancer. *J Immunol.* 2014;192(12):5451-5458.
218. Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, et al. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med.* 1985;313(23):1485-1492.
219. Amin A, White RL. High-dose interleukin-2: is it still indicated for melanoma and RCC in an era of targeted therapies? *Oncology (Williston Park).* 2013;27(7):680-691.
220. Kaufman HL, Ruby CE, Hughes T, Slingluff CL. Current status of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the immunotherapy of melanoma. *J Immunother Cancer.* 2014;2:11.
221. Senzer NN, Kaufman HL, Amatruda T, et al. Phase II clinical trial of a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-encoding, second-generation oncolytic herpesvirus in patients with unresectable metastatic melanoma. *J Clin Oncol.* 2009;27(34):5763-5771.
222. Hodi FS, Lee SJ, McDermott DF, et al. Multicenter, randomized phase II trial of GM-CSF (GM) plus ipilimumab (Ipi) versus Ipi alone in metastatic melanoma: E1608. ASCO MEETING 2013. Vol. 31; 2013.
223. Lasek W, Zagożdżon R, Jakobisiak M. Interleukin 12: still a promising candidate for tumor immunotherapy? *Cancer Immunol Immunother.* 2014;63(5):419-435.
224. Kenna T, Golden-Mason L, Norris S, Hegarty JE, O'Farrelly C, Doherty DG. Distinct subpopulations of gamma delta T cells are present in normal and tumor-bearing human liver. *Clin Immunol.* 2004;113(1):56-63.
225. Capietto AH, Martinet L, Fournié JJ. Stimulated $\gamma\delta$ T cells increase the in vivo efficacy of trastuzumab in HER-2+ breast cancer. *J Immunol.* 2011;187(2):1031-1038.
226. Meeh PF, King M, O'Brien RL, et al. Characterization of the gammadelta T cell response to acute leukemia. *Cancer Immunol Immunother.* 2006;55(9):1072-1080.
227. Siegers GM, Dhamko H, Wang XH, et al. Human V δ 1 $\gamma\delta$ T cells expanded from peripheral blood exhibit specific cytotoxicity against B-cell chronic lymphocytic leukemia-derived cells. *Cytotherapy.* 2011;13(6):753-764.
228. Correia DV, Fogli M, Hudspeth K, da Silva MG, Mavilio D, Silva-Santos B. Differentiation of human peripheral blood V δ 1+ T cells expressing the natural cytotoxicity receptor NKp30 for recognition of lymphoid leukemia cells. *Blood.* 2011;118(4):992-1001.
229. Siegers GM, Ribot EJ, Keating A, Foster PJ. Extensive expansion of primary human gamma delta T cells generates cytotoxic effector memory cells that can be labeled with Feraheme for cellular MRI. *Cancer Immunol Immunother.* 2013;62(3):571-583.
230. Dokouhaki P, Han M, Joe B, et al. Adoptive immunotherapy of cancer using ex vivo expanded human gammadelta T cells: A new approach. *Cancer Lett.* 2010;297(1):126-136.
231. Kabelitz D, Wesch D, Pitters E, Zöller M. Characterization of tumor reactivity of human V gamma 9V delta 2 gamma delta T cells in vitro and in SCID mice in vivo. *J Immunol.* 2004;173(11):6767-6776.
232. Casetti R, Perretta G, Taglioni A, et al. Drug-induced expansion and differentiation of V gamma 9V delta 2 T cells in vivo: the role of exogenous IL-2. *J Immunol.* 2005;175(3):1593-1598.
233. Oberg HH, Peipp M, Kellner C, et al. Novel bispecific antibodies increase $\gamma\delta$ T-cell cytotoxicity against pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* 2014;74(5):1349-1360.
234. Gertner-Dardenne J, Bonnafous C, Bezombes C, et al. Bromohydrin pyrophosphate enhances antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity induced by therapeutic antibodies. *Blood.* 2009;113(20):4875-4884.
235. Weiner LM, Surana R, Wang S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(5):317-327.

236. Tokuyama H, Hagi T, Mattarollo SR, et al. V gamma 9 V delta 2 T cell cytotoxicity against tumor cells is enhanced by monoclonal antibody drugs--rituximab and trastuzumab. *Int J Cancer*. 2008;122(11):2526-2534.
237. Braza MS, Klein B, Fiol G, Rossi JF. $\gamma\delta$ T-cell killing of primary follicular lymphoma cells is dramatically potentiated by GA101, a type II glycoengineered anti-CD20 monoclonal antibody. *Haematologica*. 2011;96(3):400-407.
238. Poonia B, Pauza CD. Gamma delta T cells from HIV+ donors can be expanded in vitro by zoledronate/interleukin-2 to become cytotoxic effectors for antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Cytotherapy*. 2012;14(2):173-181.
239. Maniar A, Zhang X, Lin W, et al. Human gammadelta T lymphocytes induce robust NK cell-mediated antitumor cytotoxicity through CD137 engagement. *Blood*. 2010;116(10):1726-1733.
240. Kohrt HE, Houot R, Weiskopf K, et al. Stimulation of natural killer cells with a CD137-specific antibody enhances trastuzumab efficacy in xenotransplant models of breast cancer. *J Clin Invest*. 2012;122(3):1066-1075.
241. Kobayashi H, Tanaka Y, Yagi J, et al. Safety profile and anti-tumor effects of adoptive immunotherapy using gamma-delta T cells against advanced renal cell carcinoma: a pilot study. *Cancer Immunol Immunother*. 2007;56(4):469-476.
242. Dieli F, Vermijlen D, Fulfaro F, et al. Targeting human {gamma}delta T cells with zoledronate and interleukin-2 for immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res*. 2007;67(15):7450-7457.
243. Bennouna J, Bompas E, Neidhardt EM, et al. Phase-I study of Innacell gammadelta, an autologous cell-therapy product highly enriched in gamma9delta2 T lymphocytes, in combination with IL-2, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2008;57(11):1599-1609.
244. Nakajima J, Murakawa T, Fukami T, et al. A phase I study of adoptive immunotherapy for recurrent non-small-cell lung cancer patients with autologous gammadelta T cells. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2010;37(5):1191-1197.
245. Abe Y, Muto M, Nieda M, et al. Clinical and immunological evaluation of zoledronate-activated Vgamma9gammadelta T-cell-based immunotherapy for patients with multiple myeloma. *Exp Hematol*. 2009;37(8):956-968.
246. Kobayashi H, Tanaka Y, Shimmura H, Minato N, Tanabe K. Complete remission of lung metastasis following adoptive immunotherapy using activated autologous gammadelta T-cells in a patient with renal cell carcinoma. *Anticancer Res*. 2010;30(2):575-579.
247. Nicol AJ, Tokuyama H, Mattarollo SR, et al. Clinical evaluation of autologous gamma delta T cell-based immunotherapy for metastatic solid tumours. *Br J Cancer*. 2011;105(6):778-786.
248. Izumi T, Kondo M, Takahashi T, et al. Ex vivo characterization of $\gamma\delta$ T-cell repertoire in patients after adoptive transfer of V γ 9V δ 2 T cells expressing the interleukin-2 receptor β -chain and the common γ -chain. *Cytotherapy*. 2013;15(4):481-491.
249. Wilhelm M, Kunzmann V, Eckstein S, et al. Gammadelta T cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies. *Blood*. 2003;102(1):200-206.
250. Lang JM, Kaikobad MR, Wallace M, et al. Pilot trial of interleukin-2 and zoledronic acid to augment $\gamma\delta$ T cells as treatment for patients with refractory renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2011;60(10):1447-1460.
251. Dieli F, Gebbia N, Poccia F, et al. Induction of gammadelta T-lymphocyte effector functions by bisphosphonate zoledronic acid in cancer patients in vivo. *Blood*. 2003;102(6):2310-2311.
252. Meraviglia S, Eberl M, Vermijlen D, et al. In vivo manipulation of Vgamma9Vdelta2 T cells with zoledronate and low-dose interleukin-2 for immunotherapy of advanced breast cancer patients. *Clin Exp Immunol*. 2010;161(2):290-297.

253. Bennouna J, Levy V, Sicard H, et al. Phase I study of bromohydrin pyrophosphate (BrHPP, IPH 1101), a $\gamma\delta$ T lymphocyte agonist in patients with solid tumors. *Cancer Immunol Immunother.* 2010;59(10):1521-1530.
254. Fournié JJ, Sicard H, Poupot M, et al. What lessons can be learned from $\gamma\delta$ T cell-based cancer immunotherapy trials? *Cell Mol Immunol.* 2013;10(1):35-41.
255. Martinet L, Poupot R, Fournié JJ. Pitfalls on the roadmap to $\gamma\delta$ T cell-based cancer immunotherapies. *Immunol Lett.* 2009;124(1):1-8.
256. Kunzmann V, Smetak M, Kimmel B, et al. Tumor-promoting versus tumor-antagonizing roles of $\gamma\delta$ T cells in cancer immunotherapy: results from a prospective phase I/II trial. *J Immunother.* 2012;35(2):205-213.
257. Waldmann TA. The IL-2/IL-15 receptor systems: targets for immunotherapy. *J Clin Immunol.* 2002;22(2):51-56.
258. Braza MS, Klein B. Anti-tumour immunotherapy with $\gamma\delta$ T lymphocytes: from the bench to the bedside. *Br J Haematol.* 2013;160(2):123-132.
259. Baekkevold ES, Roussigné M, Yamanaka T, et al. Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules. *Am J Pathol.* 2003;163(1):69-79.
260. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity.* 2005;23(5):479-490.
261. Mousson C, Ortega N, Girard JP. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'? *PLoS One.* 2008;3(10):e3331.
262. Martinet L, Garrido I, Filleron T, et al. Human solid tumors contain high endothelial venules: association with T- and B-lymphocyte infiltration and favorable prognosis in breast cancer. *Cancer Res.* 2011;71(17):5678-5687.
263. Lopetuso LR, Chowdhry S, Pizarro TT. Opposing Functions of Classic and Novel IL-1 Family Members in Gut Health and Disease. *Front Immunol.* 2013;4:181.
264. Villarreal DO, Weiner DB. Interleukin 33: a switch-hitting cytokine. *Curr Opin Immunol.* 2014;28:102-106.
265. Medzhitov R, Janeway CA. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science.* 2002;296(5566):298-300.
266. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:991-1045.
267. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science.* 2002;296(5566):301-305.
268. Zitvogel L, Kepp O, Kroemer G. Decoding cell death signals in inflammation and immunity. *Cell.* 2010;140(6):798-804.
269. Casares N, Pequignot MO, Tesniere A, et al. Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *J Exp Med.* 2005;202(12):1691-1701.
270. Vacchelli E, Aranda F, Eggermont A, et al. Trial Watch: Chemotherapy with immunogenic cell death inducers. *Oncoimmunology.* 2014;3(1):e27878.
271. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol.* 2007;81(1):1-5.
272. Haraldsen G, Balogh J, Pollheimer J, Sponheim J, Kuchler AM. Interleukin-33 - cytokine of dual function or novel alarmin? *Trends Immunol.* 2009;30(5):227-233.
273. Saïd-Sadier N, Ojcius DM. Alarmins, inflammasomes and immunity. *Biomed J.* 2012;35(6):437-449.
274. Lefrançois E, Cayrol C. Mechanisms of IL-33 processing and secretion: differences and similarities between IL-1 family members. *Eur Cytokine Netw.* 2012;23(4):120-127.

275. Nile CJ, Barksby E, Jitprasertwong P, Preshaw PM, Taylor JJ. Expression and regulation of interleukin-33 in human monocytes. *Immunology*. 2010;130(2):172-180.
276. Yanagawa Y, Suzuki M, Matsumoto M, Togashi H. Prostaglandin E(2) enhances IL-33 production by dendritic cells. *Immunol Lett*. 2011;141(1):55-60.
277. Li D, Guabiraba R, Besnard AG, et al. IL-33 promotes ST2-dependent lung fibrosis by the induction of alternatively activated macrophages and innate lymphoid cells in mice. *J Allergy Clin Immunol*. 2014.
278. Lopetuso LR, Scaldaferrri F, Pizarro TT. Emerging role of the interleukin (IL)-33/ST2 axis in gut mucosal wound healing and fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2012;5(1):18.
279. Yin H, Li X, Hu S, et al. IL-33 promotes Staphylococcus aureus-infected wound healing in mice. *Int Immunopharmacol*. 2013;17(2):432-438.
280. Yin H, Li X, Hu S, et al. IL-33 accelerates cutaneous wound healing involved in upregulation of alternatively activated macrophages. *Mol Immunol*. 2013;56(4):347-353.
281. Coffelt SB, Scandurro AB. Tumors sound the alarmin(s). *Cancer Res*. 2008;68(16):6482-6485.
282. Salama I, Malone PS, Mihaimeed F, Jones JL. A review of the S100 proteins in cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2008;34(4):357-364.
283. Oppenheim JJ, Yang D. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr Opin Immunol*. 2005;17(4):359-365.
284. Yang S, Xu L, Yang T, Wang F. High-mobility group box-1 and its role in angiogenesis. *J Leukoc Biol*. 2014;95(4):563-574.
285. Wang W, Zhu H, Zhang H, Zhang L, Ding Q, Jiang H. Targeting HMGB1 inhibits bladder cancer cells bioactivity by lentivirus-mediated RNA interference. *Neoplasma*. 2014.
286. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med*. 2007;13(9):1050-1059.
287. Yamazaki T, Hannani D, Poirier-Colame V, et al. Defective immunogenic cell death of HMGB1-deficient tumors: compensatory therapy with TLR4 agonists. *Cell Death Differ*. 2014;21(1):69-78.
288. Dinarello CA. Overview of the interleukin-1 family of ligands and receptors. *Semin Immunol*. 2013;25(6):389-393.
289. Sims JE, Smith DE. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(2):89-102.
290. Hong J, Bae S, Jhun H, et al. Identification of constitutively active interleukin 33 (IL-33) splice variant. *J Biol Chem*. 2011;286(22):20078-20086.
291. Meephansan J, Tsuda H, Komine M, Tominaga S, Ohtsuki M. Regulation of IL-33 expression by IFN- γ and tumor necrosis factor- α in normal human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2012;132(11):2593-2600.
292. Boraschi D, Tagliabue A. The interleukin-1 receptor family. *Semin Immunol*. 2013;25(6):394-407.
293. Sanada S, Hakuno D, Higgins LJ, Schreiter ER, McKenzie AN, Lee RT. IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system. *J Clin Invest*. 2007;117(6):1538-1549.
294. K uchler AM, Pollheimer J, Balogh J, et al. Nuclear interleukin-33 is generally expressed in resting endothelium but rapidly lost upon angiogenic or proinflammatory activation. *Am J Pathol*. 2008;173(4):1229-1242.
295. Carriere V, Roussel L, Ortega N, et al. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(1):282-287.
296. Miller AM, Xu D, Asquith DL, et al. IL-33 reduces the development of atherosclerosis. *J Exp Med*. 2008;205(2):339-346.
297. Pichery M, Mirey E, Mercier P, et al. Endogenous IL-33 is highly expressed in mouse epithelial barrier tissues, lymphoid organs, brain, embryos, and inflamed tissues: in situ analysis using a novel IL-33-LacZ gene trap reporter strain. *J Immunol*. 2012;188(7):3488-3495.

298. Byrne SN, Beaugie C, O'Sullivan C, Leighton S, Halliday GM. The immune-modulating cytokine and endogenous Alarmin interleukin-33 is upregulated in skin exposed to inflammatory UVB radiation. *Am J Pathol.* 2011;179(1):211-222.
299. Cayrol C, Girard JP. The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(22):9021-9026.
300. Lüthi AU, Cullen SP, McNeela EA, et al. Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases. *Immunity.* 2009;31(1):84-98.
301. Ali S, Nguyen DQ, Falk W, Martin MU. Caspase 3 inactivates biologically active full length interleukin-33 as a classical cytokine but does not prohibit nuclear translocation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;391(3):1512-1516.
302. Hayakawa M, Hayakawa H, Matsuyama Y, Tamemoto H, Okazaki H, Tominaga S. Mature interleukin-33 is produced by calpain-mediated cleavage in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;387(1):218-222.
303. Lefrançais E, Roga S, Gautier V, et al. IL-33 is processed into mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(5):1673-1678.
304. Lefrançais E, Duval A, Mirey E, et al. Central domain of IL-33 is cleaved by mast cell proteases for potent activation of group-2 innate lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(43):15502-15507.
305. Zhang L, Lu R, Zhao G, Pflugfelder SC, Li DQ. TLR-mediated induction of pro-allergic cytokine IL-33 in ocular mucosal epithelium. *Int J Biochem Cell Biol.* 2011;43(9):1383-1391.
306. Hudson CA, Christophi GP, Gruber RC, Wilmore JR, Lawrence DA, Massa PT. Induction of IL-33 expression and activity in central nervous system glia. *J Leukoc Biol.* 2008;84(3):631-643.
307. Kouzaki H, Iijima K, Kobayashi T, O'Grady SM, Kita H. The danger signal, extracellular ATP, is a sensor for an airborne allergen and triggers IL-33 release and innate Th2-type responses. *J Immunol.* 2011;186(7):4375-4387.
308. Kakkar R, Hei H, Dobner S, Lee RT. Interleukin 33 as a mechanically responsive cytokine secreted by living cells. *J Biol Chem.* 2012;287(9):6941-6948.
309. Ciccone MM, Cortese F, Gesualdo M, et al. A novel cardiac bio-marker: ST2: a review. *Molecules.* 2013;18(12):15314-15328.
310. Kakkar R, Lee RT. The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7(10):827-840.
311. Caporali A, Meloni M, Miller AM, et al. Soluble ST2 is regulated by p75 neurotrophin receptor and predicts mortality in diabetic patients with critical limb ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(12):e149-160.
312. Garlanda C, Anders HJ, Mantovani A. TIR8/SIGIRR: an IL-1R/TLR family member with regulatory functions in inflammation and T cell polarization. *Trends Immunol.* 2009;30(9):439-446.
313. Wald D, Qin J, Zhao Z, et al. SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nat Immunol.* 2003;4(9):920-927.
314. Qin J, Qian Y, Yao J, Grace C, Li X. SIGIRR inhibits interleukin-1 receptor- and toll-like receptor 4-mediated signaling through different mechanisms. *J Biol Chem.* 2005;280(26):25233-25241.
315. Zhao J, Wei J, Mialki RK, et al. F-box protein FBXL19-mediated ubiquitination and degradation of the receptor for IL-33 limits pulmonary inflammation. *Nat Immunol.* 2012;13(7):651-658.
316. Bessa J, Meyer CA, de Vera Mudry MC, et al. Altered subcellular localization of IL-33 leads to non-resolving lethal inflammation. *J Autoimmun.* 2014.
317. Roussel L, Erard M, Cayrol C, Girard JP. Molecular mimicry between IL-33 and KSHV for attachment to chromatin through the H2A-H2B acidic pocket. *EMBO Rep.* 2008;9(10):1006-1012.
318. Choi YS, Park JA, Kim J, et al. Nuclear IL-33 is a transcriptional regulator of NF- κ B p65 and induces endothelial cell activation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;421(2):305-311.

319. Sundlisaeter E, Edelmann RJ, Hol J, et al. The alarmin IL-33 is a notch target in quiescent endothelial cells. *Am J Pathol.* 2012;181(3):1099-1111.
320. Ali S, Mohs A, Thomas M, et al. The dual function cytokine IL-33 interacts with the transcription factor NF- κ B to dampen NF- κ B-stimulated gene transcription. *J Immunol.* 2011;187(4):1609-1616.
321. Xu D, Chan WL, Leung BP, et al. Selective expression of a stable cell surface molecule on type 2 but not type 1 helper T cells. *J Exp Med.* 1998;187(5):787-794.
322. Komai-Koma M, Xu D, Li Y, McKenzie AN, McInnes IB, Liew FY. IL-33 is a chemoattractant for human Th2 cells. *Eur J Immunol.* 2007;37(10):2779-2786.
323. Blom L, Poulsen BC, Jensen BM, Hansen A, Poulsen LK. IL-33 induces IL-9 production in human CD4+ T cells and basophils. *PLoS One.* 2011;6(7):e21695.
324. Smithgall MD, Comeau MR, Yoon BR, Kaufman D, Armitage R, Smith DE. IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells. *Int Immunol.* 2008;20(8):1019-1030.
325. Rank MA, Kobayashi T, Kozaki H, Bartemes KR, Squillace DL, Kita H. IL-33-activated dendritic cells induce an atypical TH2-type response. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123(5):1047-1054.
326. Besnard AG, Togbe D, Guillou N, Erard F, Quesniaux V, Ryffel B. IL-33-activated dendritic cells are critical for allergic airway inflammation. *Eur J Immunol.* 2011;41(6):1675-1686.
327. Moro K, Yamada T, Tanabe M, et al. Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)/Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature.* 2010;463(7280):540-544.
328. Neill DR, Wong SH, Bellosi A, et al. Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature.* 2010;464(7293):1367-1370.
329. Mjösberg JM, Trifari S, Crellin NK, et al. Human IL-25- and IL-33-responsive type 2 innate lymphoid cells are defined by expression of CRTH2 and CD161. *Nat Immunol.* 2011;12(11):1055-1062.
330. McKenzie AN, Spits H, Eberl G. Innate Lymphoid Cells in Inflammation and Immunity. *Immunity.* 2014;41(3):366-374.
331. Espinassous Q, Garcia-de-Paco E, Garcia-Verdugo I, et al. IL-33 enhances lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokine production from mouse macrophages by regulating lipopolysaccharide receptor complex. *J Immunol.* 2009;183(2):1446-1455.
332. Ohno T, Oboki K, Morita H, et al. Paracrine IL-33 stimulation enhances lipopolysaccharide-mediated macrophage activation. *PLoS One.* 2011;6(4):e18404.
333. Kurowska-Stolarska M, Stolarski B, Kewin P, et al. IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. *J Immunol.* 2009;183(10):6469-6477.
334. Zaiss MM, Kurowska-Stolarska M, Böhm C, et al. IL-33 shifts the balance from osteoclast to alternatively activated macrophage differentiation and protects from TNF-alpha-mediated bone loss. *J Immunol.* 2011;186(11):6097-6105.
335. Suzukawa M, Koketsu R, Iikura M, et al. Interleukin-33 enhances adhesion, CD11b expression and survival in human eosinophils. *Lab Invest.* 2008;88(11):1245-1253.
336. Chow JY, Wong CK, Cheung PF, Lam CW. Intracellular signaling mechanisms regulating the activation of human eosinophils by the novel Th2 cytokine IL-33: implications for allergic inflammation. *Cell Mol Immunol.* 2010;7(1):26-34.
337. Bouffi C, Rochman M, Zust CB, et al. IL-33 markedly activates murine eosinophils by an NF- κ B-dependent mechanism differentially dependent upon an IL-4-driven autoinflammatory loop. *J Immunol.* 2013;191(8):4317-4325.
338. Wong CK, Leung KM, Qiu HN, Chow JY, Choi AO, Lam CW. Activation of eosinophils interacting with dermal fibroblasts by pruritogenic cytokine IL-31 and alarmin IL-33: implications in atopic dermatitis. *PLoS One.* 2012;7(1):e29815.

339. Pecaric-Petkovic T, Didichenko SA, Kaempfer S, Spiegl N, Dahinden CA. Human basophils and eosinophils are the direct target leukocytes of the novel IL-1 family member IL-33. *Blood*. 2009;113(7):1526-1534.
340. Suzukawa M, Iikura M, Koketsu R, et al. An IL-1 cytokine member, IL-33, induces human basophil activation via its ST2 receptor. *J Immunol*. 2008;181(9):5981-5989.
341. Schneider E, Petit-Bertron AF, Bricard R, et al. IL-33 activates unprimed murine basophils directly in vitro and induces their in vivo expansion indirectly by promoting hematopoietic growth factor production. *J Immunol*. 2009;183(6):3591-3597.
342. Allakhverdi Z, Smith DE, Comeau MR, Delespesse G. Cutting edge: The ST2 ligand IL-33 potently activates and drives maturation of human mast cells. *J Immunol*. 2007;179(4):2051-2054.
343. Ali S, Huber M, Kollewe C, Bischoff SC, Falk W, Martin MU. IL-1 receptor accessory protein is essential for IL-33-induced activation of T lymphocytes and mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(47):18660-18665.
344. Andrade MV, Iwaki S, Ropert C, Gazzinelli RT, Cunha-Melo JR, Beaven MA. Amplification of cytokine production through synergistic activation of NFAT and AP-1 following stimulation of mast cells with antigen and IL-33. *Eur J Immunol*. 2011;41(3):760-772.
345. Junttila IS, Watson C, Kummola L, et al. Efficient cytokine-induced IL-13 production by mast cells requires both IL-33 and IL-3. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132(3):704-712.e710.
346. Enoksson M, Möller-Westerberg C, Wicher G, et al. Intraperitoneal influx of neutrophils in response to IL-33 is mast cell-dependent. *Blood*. 2013;121(3):530-536.
347. Hueber AJ, Alves-Filho JC, Asquith DL, et al. IL-33 induces skin inflammation with mast cell and neutrophil activation. *Eur J Immunol*. 2011;41(8):2229-2237.
348. Verri WA, Souto FO, Vieira SM, et al. IL-33 induces neutrophil migration in rheumatoid arthritis and is a target of anti-TNF therapy. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(9):1697-1703.
349. Alves-Filho JC, Sônego F, Souto FO, et al. Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. *Nat Med*. 2010;16(6):708-712.
350. Komai-Koma M, Brombacher F, Pushparaj PN, et al. Interleukin-33 amplifies IgE synthesis and triggers mast cell degranulation via interleukin-4 in naïve mice. *Allergy*. 2012;67(9):1118-1126.
351. Komai-Koma M, Gilchrist DS, McKenzie AN, Goodyear CS, Xu D, Liew FY. IL-33 activates B1 cells and exacerbates contact sensitivity. *J Immunol*. 2011;186(4):2584-2591.
352. Wasserman A, Ben-Shoshan J, Entin-Meer M, Maysel-Auslender S, Guzner-Gur H, Keren G. Interleukin-33 augments Treg cell levels: a flaw mechanism in atherosclerosis. *Isr Med Assoc J*. 2012;14(10):620-623.
353. Turnquist HR, Zhao Z, Rosborough BR, et al. IL-33 expands suppressive CD11b+ Gr-1(int) and regulatory T cells, including ST2L+ Foxp3+ cells, and mediates regulatory T cell-dependent promotion of cardiac allograft survival. *J Immunol*. 2011;187(9):4598-4610.
354. Brunner SM, Schiechl G, Falk W, Schlitt HJ, Geissler EK, Fichtner-Feigl S. Interleukin-33 prolongs allograft survival during chronic cardiac rejection. *Transpl Int*. 2011;24(10):1027-1039.
355. Duan L, Chen J, Zhang H, et al. Interleukin-33 ameliorates experimental colitis through promoting Th2/Foxp3+ regulatory T-cell responses in mice. *Mol Med*. 2012;18:753-761.
356. Matta BM, Lott JM, Mathews LR, et al. IL-33 Is an Unconventional Alarmin That Stimulates IL-2 Secretion by Dendritic Cells To Selectively Expand IL-33R/ST2+ Regulatory T Cells. *J Immunol*. 2014;193(8):4010-4020.
357. Schiering C, Krausgruber T, Chomka A, et al. The alarmin IL-33 promotes regulatory T-cell function in the intestine. *Nature*. 2014;513(7519):564-568.
358. Yang Q, Li G, Zhu Y, et al. IL-33 synergizes with TCR and IL-12 signaling to promote the effector function of CD8+ T cells. *Eur J Immunol*. 2011;41(11):3351-3360.
359. Ngoi SM, St Rose MC, Menoret AM, et al. Presensitizing with a Toll-like receptor 3 ligand impairs CD8 T-cell effector differentiation and IL-33 responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(26):10486-10491.

360. Gao K, Li X, Zhang L, et al. Transgenic expression of IL-33 activates CD8(+) T cells and NK cells and inhibits tumor growth and metastasis in mice. *Cancer Lett.* 2013;335(2):463-471.
361. Skon CN, Lee JY, Anderson KG, Masopust D, Hogquist KA, Jameson SC. Transcriptional downregulation of S1pr1 is required for the establishment of resident memory CD8+ T cells. *Nat Immunol.* 2013;14(12):1285-1293.
362. Bonilla WV, Fröhlich A, Senn K, et al. The alarmin interleukin-33 drives protective antiviral CD8+ T cell responses. *Science.* 2012;335(6071):984-989.
363. Villarreal D, Wise M, Walters J, et al. Alarmin IL-33 Acts as an Immunoadjuvant to Enhance Antigen-specific Anti-viral Immunity. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2014;30 Suppl 1:A195-196.
364. Villarreal DO, Wise MC, Walters JN, et al. Alarmin IL-33 acts as an immunoadjuvant to enhance antigen-specific tumor immunity. *Cancer Res.* 2014;74(6):1789-1800.
365. Bourgeois E, Van LP, Samson M, et al. The pro-Th2 cytokine IL-33 directly interacts with invariant NKT and NK cells to induce IFN-gamma production. *Eur J Immunol.* 2009;39(4):1046-1055.
366. Milovanovic M, Volarevic V, Radosavljevic G, et al. IL-33/ST2 axis in inflammation and immunopathology. *Immunol Res.* 2012;52(1-2):89-99.
367. Volarevic V, Mitrovic M, Milovanovic M, et al. Protective role of IL-33/ST2 axis in Con A-induced hepatitis. *J Hepatol.* 2012;56(1):26-33.
368. Oboki K, Nakae S, Matsumoto K, Saito H. IL-33 and Airway Inflammation. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2011;3(2):81-88.
369. Haenuki Y, Matsushita K, Futatsugi-Yumikura S, et al. A critical role of IL-33 in experimental allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;130(1):184-194.e111.
370. Salimi M, Barlow JL, Saunders SP, et al. A role for IL-25 and IL-33-driven type-2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis. *J Exp Med.* 2013;210(13):2939-2950.
371. Zdravkovic N, Shahin A, Arsenijevic N, Lukic ML, Mensah-Brown EP. Regulatory T cells and ST2 signaling control diabetes induction with multiple low doses of streptozotocin. *Mol Immunol.* 2009;47(1):28-36.
372. Zdravkovic N, Pavlovic S, Zdravkovic V, Pejnovic N, Arsenijevic N, Lukic ML. ST2 gene-deletion reveals a role of Foxp3+ regulatory T cells in diabetes modulation in BALB/c mice. *Transl Res.* 2013;161(2):118-129.
373. Liew FY, Pitman NI, McInnes IB. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(2):103-110.
374. Shah KB, Kop WJ, Christenson RH, et al. Prognostic utility of ST2 in patients with acute dyspnea and preserved left ventricular ejection fraction. *Clin Chem.* 2011;57(6):874-882.
375. Hung LY, Lewkowich IP, Dawson LA, et al. IL-33 drives biphasic IL-13 production for noncanonical Type 2 immunity against hookworms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(1):282-287.
376. Yasuda K, Muto T, Kawagoe T, et al. Contribution of IL-33-activated type II innate lymphoid cells to pulmonary eosinophilia in intestinal nematode-infected mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(9):3451-3456.
377. Maizels RM, Hewitson JP, Smith KA. Susceptibility and immunity to helminth parasites. *Curr Opin Immunol.* 2012;24(4):459-466.
378. Sattler S, Smits HH, Xu D, Huang FP. The evolutionary role of the IL-33/ST2 system in host immune defence. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2013;61(2):107-117.
379. Le Goffic R, Arshad MI, Rauch M, et al. Infection with influenza virus induces IL-33 in murine lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011;45(6):1125-1132.
380. Santulli P, Even M, Chouzenoux S, et al. Profibrotic interleukin-33 is correlated with uterine leiomyoma tumour burden. *Hum Reprod.* 2013;28(8):2126-2133.
381. Sun P, Ben Q, Tu S, Dong W, Qi X, Wu Y. Serum interleukin-33 levels in patients with gastric cancer. *Dig Dis Sci.* 2011;56(12):3596-3601.
382. Liu J, Shen JX, Hu JL, Huang WH, Zhang GJ. Significance of interleukin-33 and its related cytokines in patients with breast cancers. *Front Immunol.* 2014;5:141.

383. Lu DP, Zhou XY, Yao LT, et al. Serum soluble ST2 is associated with ER-positive breast cancer. *BMC Cancer*. 2014;14:198.
384. Zhang P, Liu XK, Chu Z, et al. Detection of interleukin-33 in serum and carcinoma tissue from patients with hepatocellular carcinoma and its clinical implications. *J Int Med Res*. 2012;40(5):1654-1661.
385. Bergis D, Kassis V, Ranglack A, et al. High Serum Levels of the Interleukin-33 Receptor Soluble ST2 as a Negative Prognostic Factor in Hepatocellular Carcinoma. *Transl Oncol*. 2013;6(3):311-318.
386. Hu LA, Fu Y, Zhang DN, Zhang J. Serum IL-33 as a diagnostic and prognostic marker in non-small cell lung cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(4):2563-2566.
387. Naumnik W, Naumnik B, Niewiarowska K, Ossolinska M, Chyczewska E. Novel cytokines: IL-27, IL-29, IL-31 and IL-33. Can they be useful in clinical practice at the time diagnosis of lung cancer? *Exp Oncol*. 2012;34(4):348-353.
388. Gangemi S, Allegra A, Profita M, et al. Decreased plasma levels of IL-33 could contribute to the altered function of Th2 lymphocytes in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Cancer Invest*. 2013;31(3):212-213.
389. Musolino C, Allegra A, Profita M, et al. Reduction in IL-33 plasma levels might be involved in T cell dysregulation in chronic lymphocytic leukemia. *Acta Haematol*. 2014;131(3):165-166.
390. Musolino C, Allegra A, Profita M, et al. Reduced IL-33 plasma levels in multiple myeloma patients are associated with more advanced stage of disease. *Br J Haematol*. 2013;160(5):709-710.
391. Chen XJ, Huang YD, Li N, et al. Correlations between serum IL33 and tumor development: a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(8):3503-3505.
392. Chen SF, Nieh S, Jao SW, et al. The paracrine effect of cancer-associated fibroblast-induced interleukin-33 regulates the invasiveness of head and neck squamous cell carcinoma. *J Pathol*. 2013;231(2):180-189.
393. Liu X, Zhu L, Lu X, et al. IL-33/ST2 pathway contributes to metastasis of human colorectal cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014.
394. Cui G, Qi H, Gundersen MD, et al. Dynamics of the IL-33/ST2 network in the progression of human colorectal adenoma to sporadic colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2014.
395. Yoshida K, Arai T, Yokota T, et al. Studies on natural ST2 gene products in the human leukemic cell line UT-7 using monoclonal antihuman ST2 antibodies. *Hybridoma*. 1995;14(5):419-427.
396. Tsuchiya T, Ohshima K, Karube K, et al. Th1, Th2, and activated T-cell marker and clinical prognosis in peripheral T-cell lymphoma, unspecified: comparison with AILD, ALCL, lymphoblastic lymphoma, and ATLL. *Blood*. 2004;103(1):236-241.
397. Fang KM, Yang CS, Lin TC, Chan TC, Tzeng SF. Induced interleukin-33 expression enhances the tumorigenic activity of rat glioma cells. *Neuro Oncol*. 2014;16(4):552-566.
398. Levescot A, Flamant S, Basbous S, et al. BCR-ABL-induced deregulation of the IL-33/ST2 pathway in CD34+ progenitors from chronic myeloid leukemia patients. *Cancer Res*. 2014;74(10):2669-2676.
399. Schmieder A, Multhoff G, Radons J. Interleukin-33 acts as a pro-inflammatory cytokine and modulates its receptor gene expression in highly metastatic human pancreatic carcinoma cells. *Cytokine*. 2012;60(2):514-521.
400. Ishikawa K, Yagi-Nakanishi S, Nakanishi Y, et al. Expression of interleukin-33 is correlated with poor prognosis of patients with squamous cell carcinoma of the tongue. *Auris Nasus Larynx*. 2014.
401. Jovanovic IP, Pejnovic NN, Radosavljevic GD, et al. Interleukin-33/ST2 axis promotes breast cancer growth and metastases by facilitating intratumoral accumulation of immunosuppressive and innate lymphoid cells. *Int J Cancer*. 2014;134(7):1669-1682.
402. Jovanovic I, Radosavljevic G, Mitrovic M, et al. ST2 deletion enhances innate and acquired immunity to murine mammary carcinoma. *Eur J Immunol*. 2011;41(7):1902-1912.

403. Jovanovic IP, Pejnovic NN, Radosavljevic GD, Arsenijevic NN, Lukic ML. IL-33/ST2 axis in innate and acquired immunity to tumors. *Oncoimmunology*. 2012;1(2):229-231.
404. Gao X, Wang X, Yang Q, et al. Tumoral Expression of IL-33 Inhibits Tumor Growth and Modifies the Tumor Microenvironment through CD8+ T and NK Cells. *J Immunol*. 2015;194(1):438-445.
405. Ribot JC, Debarros A, Mancio-Silva L, Pamplona A, Silva-Santos B. B7-CD28 costimulatory signals control the survival and proliferation of murine and human $\gamma\delta$ T cells via IL-2 production. *J Immunol*. 2012;189(3):1202-1208.
406. Pechhold K, Wesch D, Schondelmaier S, Kabelitz D. Primary activation of V gamma 9-expressing gamma delta T cells by Mycobacterium tuberculosis. Requirement for Th1-type CD4 T cell help and inhibition by IL-10. *J Immunol*. 1994;152(10):4984-4992.
407. Horner AA, Jabara H, Ramesh N, Geha RS. gamma/delta T lymphocytes express CD40 ligand and induce isotype switching in B lymphocytes. *J Exp Med*. 1995;181(3):1239-1244.
408. Inoue S, Niikura M, Takeo S, et al. Enhancement of dendritic cell activation via CD40 ligand-expressing $\gamma\delta$ T cells is responsible for protective immunity to Plasmodium parasites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(30):12129-12134.
409. Legrand F, Driss V, Delbeke M, et al. Human eosinophils exert TNF- α and granzyme A-mediated tumoricidal activity toward colon carcinoma cells. *J Immunol*. 2010;185(12):7443-7451.
410. Legrand F, Driss V, Woerly G, et al. A functional gammadeltaTCR/CD3 complex distinct from gammadeltaT cells is expressed by human eosinophils. *PLoS One*. 2009;4(6):e5926.

LES IMMUNOTHERAPIES DANS LE TRAITEMENT DU CANCER : EXEMPLE DE LA POTENTIALISATION DE L'ACTIVITE ANTICANCEREUSE DES LYMPHOCYTES T $\gamma\delta$ PAR L'IL-33

Depuis quelques années, les nouvelles stratégies de traitement du cancer s'orientent vers des thérapies plus ciblées, comme les immunothérapies, avec l'espoir d'obtenir une plus grande efficacité et moins d'effets indésirables que les traitements conventionnels. Parmi les stratégies existantes, certaines sont basées sur les propriétés antitumorales des lymphocytes T V γ 9V δ 2. En effet, certaines cellules cancéreuses produisent en grande quantité des agonistes spécifiques de ces lymphocytes, les phosphoantigènes (PAg). Ainsi activés au contact des cellules cancéreuses, les lymphocytes T V γ 9V δ 2 répondent en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires et en induisant la lyse de leurs cellules cibles par des mécanismes de cytotoxicité cellulaire. Ces propriétés ont déjà été exploitées en immunothérapie et plusieurs essais cliniques de phase I et II ont montré des résultats prometteurs. Cependant, l'utilisation de ces thérapies reste limitée en raison de la forte toxicité de l'IL-2 essentielle à l'expansion des lymphocytes T V γ 9V δ 2. Il est donc nécessaire de trouver de nouveaux facteurs de croissance pour les amplifier. L'IL-33, une alarmine naturellement présente dans le microenvironnement tumoral, pourrait jouer ce rôle. Cette cytokine, principalement connue pour son rôle inducteur de réponse immunitaire Th2, peut également être impliquée dans les réponses immunitaires de type Th1 et dans l'immunité antitumorale. Au cours de notre étude, nous avons montré que la combinaison d'un PAg avec l'IL-33 induit la prolifération des lymphocytes T V γ 9V δ 2 *in vitro*. Après amplification, ces lymphocytes possèdent les mêmes caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles que ceux classiquement amplifiés par PAg et IL-2. Par conséquent, l'IL-33 pourrait représenter une alternative à l'IL-2 dans les immunothérapies anticancéreuses basées sur les lymphocytes T V γ 9V δ 2.

Immunotherapies in cancer treatments: harnessing IL-33 bioactivity to $\gamma\delta$ T cell-based immunotherapies.

Since a few years, new cancer treatment strategies are focused on more targeted therapies, such as immunotherapies, with the hope of achieving greater efficiency and fewer side effects than conventional treatments. From existing strategies, some are based on the antitumor properties of V γ 9V δ 2 T cells. Indeed, some cancer cells produce large amount of specific agonists of these cells, the phosphoantigens (PAg). So, upon a contact with cancer cells, V γ 9V δ 2 T cells respond by secreting pro-inflammatory cytokines and cell-mediated cytotoxicity. These properties have been exploited in immunotherapy and several clinical trials have shown promising results. However, the use of these therapies is limited because of the high toxicity of IL-2 which is mandatory for V γ 9V δ 2 T cell expansion. Therefore, finding new growth factors to amplify V γ 9V δ 2 T cells is essential. IL-33, an alarmin naturally found in the tumor microenvironment might play this role. This cytokine, mainly known for its role in inducing Th2 immune response, may also be involved in Th1 immune responses and in antitumor immunity. In our study, we showed that the combination of a PAg with IL-33 induces the proliferation of V γ 9V δ 2 T cells *in vitro*. After amplification, these cells display the same phenotype and cellular functions as those usually amplified by PAg and IL-2. Therefore, these study suggest that IL-33 represents an alternative to IL-2 in V γ 9V δ 2 T cell-based immunotherapies.

DISCIPLINE administrative : PHARMACIE

MOTS-CLES : Immunothérapies, lymphocytes T $\gamma\delta$, IL-33, cancer, IL-2, microenvironnement tumoral

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :

Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse - CRCT
UMR1037 Inserm/Université Toulouse III Paul Sabatier/ERL5294 CNRS
Oncopôle de Toulouse - CS 53717
2 avenue Hubert Curien
31037 TOULOUSE CEDEX 1 - FRANCE

Directeur de thèse : Dr Mary POUPOT